

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



TESIS DOCTORAL

**Caracterización y evaluación *in vitro* e *in vivo* de bacterias lácticas de
origen acuático como probióticos para el cultivo del rodaballo
(*Scophthalmus maximus* L.)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Estefanía Muñoz Atienza

Directores

Luis M. Cintas Izarra
Carmen Herranz Sorribes
Pablo E. Hernández Cruza

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN *in vitro* E *in vivo*
DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO
COMO PROBIÓTICOS PARA EL CULTIVO
DEL RODABALLO (*Scophthalmus maximus* L.)**

TESIS DOCTORAL

ESTEFANÍA MUÑOZ ATIENZA

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN *in vitro* E *in vivo*
DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO
COMO PROBIÓTICOS PARA EL CULTIVO
DEL RODABALLO (*Scophthalmus maximus* L.)**

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de
“Doctorado Europeo”, presenta la Licenciada y Máster
Estefanía Muñoz Atienza

Madrid, marzo de 2015



Departamento de Nutrición, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91-394 3749. Fax: 91-394 3743

LUIS M. CINTAS IZARRA, CARMEN HERRANZ SORRIBES Y PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA, PROFESOR TITULAR DE UNIVERSIDAD, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA Y CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, RESPECTIVAMENTE, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (UCM),

CERTIFICAN:

Que, la Tesis Doctoral titulada **“Caracterización y evaluación *in vitro* e *in vivo* de bacterias lácticas de origen acuático como probióticos para el cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.)”**, de la que es autora la Licenciada en Veterinaria y Máster en Investigación en Ciencias Veterinarias Dña. Estefanía Muñoz Atienza, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UCM, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la UCM con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Y, para que surta los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid a diez de marzo de dos mil quince

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Luis M. Cintas Izarra

Carmen Herranz Sorribes

Pablo E. Hernández Cruza

A mi familia

A Carlos

En memoria de mi abuela Paca

Vamos juntos

*"Con tu puedo y con mi quiero
vamos juntos compañero.*

*Compañero te desvela
la misma suerte que a mi
prometiste y prometí
encender esta candela.*

*Con tu puedo y con mi quiero
vamos juntos compañero.*

*La muerte mata y escucha
la vida viene después
la unidad que sirve es
la que nos une en la lucha.*

*Con tu puedo y con mi quiero
vamos juntos compañero.*

*La historia tañe sonora
su lección como campana
para gozar el mañana
hay que pelear el ahora.*

*Con tu puedo y con mi quiero
vamos juntos compañero.*

*Ya no somos inocentes
ni en la mala ni en la buena
cada cual en su faena
porque en esto no hay suplentes.*

*Con tu puedo y con mi quiero
vamos juntos compañero.*

*Algunos cantan victoria
porque el pueblo paga vidas
pero esas muertes queridas
van escribiendo la historia.*

*Con tu puedo y con mi quiero
vamos juntos compañero".*

Mario Benedetti (1920-2009)

You cannot get through a single day without having an impact on the world around you. What you do makes a difference, and you have to decide what kind of difference you want to make

Jane Goodall (1934)

La verdadera ciencia enseña, sobre todo, a dudar y a ser ignorante

Miguel de Unamuno (1864-1936)

Be less curious about people and more curious about ideas

Maria Salomea Skłodowska-Curie (1867-1934)

Quisiera dar las gracias a todas las personas que han permitido, participado o contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral, así como a todas aquellas a las que he tenido la oportunidad de conocer y trabajar con ellas durante los años dedicados a este trabajo investigador.

A los directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria durante el período de realización de este trabajo investigador, Lorenzo de la Hoz Perales y María Dolores Selgas Cortecero, por aceptarme en este Departamento y por la amabilidad con la que me han tratado siempre.

Me gustaría expresar mi gratitud de manera especial a mis directores de tesis, Luis M. Cintas Izarra, Carmen Herranz Sorribes y Pablo E. Hernández Cruza, por la confianza que depositaron en mí al permitirme formar parte de su grupo de investigación y por la ayuda que me habéis ofrecido desde que llegué a vuestro laboratorio para la realización de este trabajo. A Luis, por tu constante dedicación y ayuda para hacer siempre un buen trabajo, por enseñarme la manera de hacer las cosas bien, por mostrarme tu confianza y apoyo incondicional desde el principio y por transmitirme que se puede salir adelante a pesar de las adversidades. A Carmen, por tu dedicación desde el primer día para enseñarme cómo se trabaja en el laboratorio, por tu disponibilidad para resolver las dudas que me han surgido durante todos estos años, por la amabilidad que me has mostrado siempre y por tus consejos dentro y fuera del laboratorio. A Pablo, por transmitirme el entusiasmo y la dedicación que se puede tener hacia el trabajo día tras día, por tener siempre la puerta abierta de tu despacho para resolver cualquier problema y por tus cariñosas letras que he recibido siempre cuando he estado de estancia.

También quiero dar las gracias a los demás miembros del Departamento que, de una u otra manera, han hecho posible esta Tesis Doctoral. A todos los profesores del Departamento, no sólo porque hemos compartido todo este tiempo juntos, sino también porque habéis sido mis profesores durante mis estudios de Licenciatura y Máster en Veterinaria. Gracias a Charo, Fernanda, Teresa, Isabel, Paloma y Ana por vuestra ayuda cuando la he necesitado. Gracias a María, Juan Miguel, Eva y Lola R. por vuestra simpatía y por esas conversaciones y momentos que hemos compartido en la cocina del Departamento. Por supuesto, no podría dejar de acordarme de Santiago, Andrés, Alberto y Rosi, gracias a todos por vuestra amabilidad, en especial a Aurora por su atención en todo y su disponibilidad.

A todos mis compañeros del laboratorio “punto LAB”, por todos los momentos que hemos compartido. Siempre os llevaré en mi recuerdo. A Bea, por abrirme las puertas de tu casa y por haber vivido y compartido conmigo esos meses tan especiales durante mi estancia en Vigo. Muchas gracias por escucharme y preguntarme todos los días cómo me encontraba. El tiempo que pasé en tu pueblo, Panxón, fue inolvidable. Me llevo uno de los mejores momentos que he pasado en el desarrollo de esta Tesis. También quería agradecerte tu ayuda y apoyo que me has dado en todo momento para seguir adelante con este trabajo. A Cristina, por todos los momentos que hemos vivido juntas, por todas esas reflexiones que has compartido con nosotros y por tu buena disposición para ayudar siempre. A Loreto, por enseñarme a ver el lado positivo de los resultados cuando por mí misma no era capaz y por tu ayuda cuando la he necesitado. A Juan, por transmitir esa tranquilidad y seriedad en el trabajo y por tu humor irónico que me encantaba. A Juanjo, por transmitir tu positividad en el laboratorio todos los días, por tu disposición para escuchar

siempre los problemas de los demás y por tu buen talante ante las críticas. A Sara, por estar siempre dispuesta a ayudar y por tu amistad. Sarita, muchas gracias por los momentos que hemos pasado juntas, dentro y fuera del laboratorio, por tus sabios consejos y por esos viajes en los que siempre aprendo algo nuevo. A las nuevas incorporaciones: Eva e Idoia, que aunque hayamos compartido poco tiempo, os agradezco vuestra confianza. A los veteranos, Jorge y Antonio, porque aunque no hayamos trabajado durante la misma época, he podido ver el resultado final de vuestros trabajos y agradezco vuestro apoyo en los momentos que hemos coincidido. Finalmente, a todos los que habéis pasado en algún momento por nuestro laboratorio: a Maliko, Tereza, Andreia, Gabriela, Laura, Elena, Clara, Yoshimitsu, y, especialmente, a Marisol, por su cariño. Muchas gracias a todos, de todos he aprendido algo nuevo.

Quería agradecer al resto de becarios del Departamento, a los compañeros “del laboratorio del fondo” y “del laboratorio de al lado” a los que tengo que agradecer su ayuda cuando la he necesitado y por los momentos tan buenos que hemos pasado juntos en “El Lagar”: Silvia, Miguel Ángel, Nicolette, Alicia, Inés, Samuel, Diego, María, Violeta, Almudena, Eugenia, Rebeca, Nivia, Esther, Virginia, Maldo, Arantxa, Marta, Irene(s), Susana, Javi, Laura... Especialmente quería agradecerles a aquellos con los que más he convivido, sobre todo durante las comidas en las que nos ha dado tiempo a divagar sobre todo los temas posibles e imaginarios. A Silvia, por tu confianza, por tu ayuda y por tu amistad. Silvinha, eres un encanto, espero que sigas enseñándome todas esas cosas que hay en el universo y que a veces no soy capaz de ver. A Rebeca, por tu buena disposición para ayudar en cualquier momento y tu simpatía. A Nico, por los momentos que compartimos juntas en las clases del máster y por contarnos siempre tus vivencias tan graciosas, amenizando las comidas en la cafetería. A Miguelito, por tu simpatía y por los momentos que me he reído contigo. A Ali, por el compañerismo que me has mostrado en todo momento y por tu cercanía y simpatía. A Inés, por preguntarme siempre cómo estoy y porque siempre recordaré tu “*ok, bye bye*”. Y a Satawata, Raquel y Aina, las nuevas incorporaciones, por vuestra simpatía.

I would like to thank Peter Bossier for accepting me in his research laboratory (Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center [ARC], Department of Animal Production, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium) and for supervising my research work during my stay. Thanks Kartik for teaching me the protocols and Tom Baelemans for the help given at every moment. Thanks lab technicians, PhD students and postdoc researchers for their help, specially my dear friends Bing, Xuan, Natrah, Lenny, Toi and Michael for their affection and for making my stay the most enjoyable, and everybody working at ARC! It was a great experience in my life! Finally, I would like to thank Liesbeth for her friendship.

No puedo dejar de agradecer a la Dra. Rosario Muñoz del Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI-CSIC) que me permitiera trabajar en su laboratorio para que parte de este trabajo se pudiera realizar. También quisiera agradecer a los estudiantes de doctorado, investigadores y personal técnico su ayuda, en especial a Gerardo, por enseñarme la técnica de TLC y por su amabilidad durante mi estancia. También agradezco a la Dra. Rosa del Campo, del Hospital Universitario Ramón y Cajal, por tu constante disponibilidad para ayudar en este trabajo de investigación y por la positividad que transmites y a Merche, por su simpatía.

Agradezco a Valentín Trujillo, Director del Centro Oceanográfico de Vigo, que me permitiera realizar una estancia de investigación en el Instituto Español de Oceanografía (IEO). Quisiera agradecer de forma especial a Susana Magadán, por su constante dedicación durante mi estancia en el IEO. Gracias por enseñarme el emocionante mundo de la inmunología, por haberme hecho fácil y gratificante el tiempo que estuve en Vigo y por transmitirme la ilusión por la investigación. Muchas gracias por tus aportaciones a nivel científico, así como por tu confianza y amistad. Ha sido un honor trabajar contigo y espero que nuestra relación siga en el futuro. También quiero dar las gracias a Nuria, más que una compañera en el IEO, has sido una amiga, siempre estuviste pendiente de mí y me cuidaste con mucho cariño y también a Montse, por tu ayuda y por compartir conmigo tus experiencias en el mundo investigador. A Elena, por escucharme todos los días cuando iba a visitarte al otro edificio, por iniciarme en el mundo de la estadística y por tu cariño. También agradecer a Pedro su simpatía y su forma de hacernos reír todos los días. Y a todo el personal del IEO que me enseñasteis el mundo de la acuicultura, y en especial a Rosa M. Cal por proporcionarnos los rodaballos que necesitábamos para hacer los ensayos. Os agradezco de corazón los buenos momentos que pasé en el IEO de Vigo. También agradezco a Francisco Gambón-Deza de la Unidad de Inmunología del Hospital do Meixoeiro (Pontevedra), por permitirnos trabajar con el equipo de citometría de flujo.

También quiero agradecer a Ysabel Santos del Departamento de Microbiología y Parasitología del Centro de Investigaciones Biológicas (CIBUS) de la Universidad de Santiago de Compostela (Santiago de Compostela, La Coruña), que permitiera integrarme en su grupo de investigación durante mi estancia de investigación y que me enseñara con entusiasmo todo lo que sabe sobre patología del rodaballo. Gracias a Ana Riaza, por suministrarnos los rodaballos que utilicé en los ensayos durante mi estancia en Santiago de Compostela. Gracias a mis compañeros, Paula, Naiara, Alba, Samuel, Lucas y Cris, por hacerme agradable los meses que pasé con vosotros y llevarme a conocer las tardes compostelanas.

Igualmente, quisiera agradecer a la Universidad Complutense de Madrid (UCM) la concesión de una Beca Predoctoral para la Formación de Personal Investigador (Becas Complutense Predoctorales en España 2010), así como al Ministerio de Educación la subvención para realizar una estancia de movilidad en el *Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center (Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium)* y poder así optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”. Este trabajo investigador ha sido realizado con fondos concedidos por la Comunidad de Madrid (CAM, Proyectos S2009/AGR-1469, S2009/AGR-1489 y P2013/ABI-2747), Banco Santander Central Hispano-Universidad Complutense de Madrid (BSCH-UCM, Proyecto GR35-10-A), Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT, Proyectos AGL2009-08348-ALI y Consolider INGENIO 2010 CSD2007-00063 FUN-C-FOOD), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, Proyecto AGL2012-34829), Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Proyecto *Spanish-Portuguese Integrated Action* HP2008-0070), Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Proyecto RM2008-00002) y Centro Oceanográfico de Vigo-Instituto Español de Oceanografía (IEO, Proyecto TEBAMOL).

También quiero agradecer a Christian Michel (Institut National de la Recherche Agronomique [INRA], Jouy-en-Josas, Francia) por suministrarnos las cepas bacterianas patógenas de peces que se utilizaron como microorganismos indicadores en los ensayos de actividad antimicrobiana, a Carmen Torres (Universidad de la Rioja), Tracy J. Eaton (Institute of Food Research, Norwich, Reino Unido) y Vanessa Vankerkhoven (University of Antwerp, Antwerp, Bélgica) por proporcionarlos las cepas bacterianas que se utilizaron como controles de PCR y a Paolo Natale por su ayuda en la creación del material gráfico de la región nucleotídica que contiene el gen que codifica la tiramina en las cepas *Enterococcus faecium* DO, BCS59 y MV5.

A mis queridísimas amigas veterinarias, a Paz, Sandra, Violeta, Isa, Sara, Cristina, Nieves y María, por vuestro apoyo incondicional desde que empecé este proyecto. Muchas gracias por escuchar mis inquietudes durante todos estos años y que, entendiendo más o menos este trabajo, siempre mostrasteis interés y me animasteis. También quería agradecer todos los momentos inolvidables que hemos pasado juntas. De vosotras he aprendido que con esfuerzo y trabajo se pueden lograr los objetivos. También quería agradecer a mis compis de baile, Emi, Maite, Sharon, Leire, Elena y Ruth, por compartir todos estos años conmigo y por preocuparos por mí en todo momento, y a mi profesora Marcela, por tu profesionalidad, por transmitirme tu fuerza y por darme ánimos todos los días. Gracias a todas, os quiero.

Especialmente quiero dar las gracias a toda mi familia. A mis padres, Cory y Mariano, por darme siempre vuestro apoyo y cariño en todos estos años en los que he pasado por momentos difíciles y que vosotros bien lo sabéis y por vuestro interés en mi progreso. Muchas gracias mamá, por tu comprensión en todos esos momentos en los que no veía sentido para continuar y por motivarme todos los días con tus palabras. Siempre serás la persona más importante en mi vida. A mis abuelos/as, mis tíos/as y mis primos/as porque cada uno de vosotros me habéis ayudado cuando os he necesitado. En especial, a mis abuelos, Mario y Paca, por vuestro cariño y amor. Os agradezco que siempre me hayáis tratado con tanta ternura. Lamento que mi abuela Paca no esté para compartir el final de esta etapa. Tu recuerdo siempre está presente entre nosotros. Muchas gracias Judith, Pilar, Marisol, Maricruz, Margarita, Gema, Gemita, M^a Ángeles, Álvaro, Julián, Paco, Rafa y Dani, por vuestro cariño y comprensión y vuestros consejos y al pequeño Mario porque siempre me sacas una sonrisa. A Mina, Antonio, Fátima y Sergio, por vuestro afecto y confianza desde el primer día, gracias por tratarme como una más de la familia.

Finalmente, quería darte las gracias a ti, Carlos, porque eres lo mejor que me ha pasado en la vida. Desde el principio supiste conocerme, transformar mis defectos en virtudes y cuidarme con mucho cariño. Durante estos años hemos compartido muchas cosas, hemos sido compañeros de laboratorio y también de vida. En el laboratorio, has sido el mejor compañero para todos, siempre dispuesto a ayudar, has tenido siempre buen sentido del humor y has hecho que los días de trabajo no fueran tan duros. En mi vida, has sido la mejor persona que podría tener a mi lado para compartirla. Quiero agradecerte todo tu apoyo en esta difícil etapa para los dos que espero que lo recordemos como el principio de algo mucho mejor. Muchas gracias por luchar a mi lado para que cumplamos juntos nuestros sueños.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	9

Capítulo I/Chapter I

EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR: OBJETIVOS	17
GENERAL ACCOUNT OF THE RESEARCH SUBJECT: OBJECTIVES	25

Capítulo II

INTRODUCCIÓN	31
II.1. LA ACUICULTURA	33
II.1.1. DEFINICIÓN DE ACUICULTURA Y SISTEMAS DE CULTIVO	33
II.1.2. HISTORIA DE LA ACUICULTURA	34
II.1.3. ESTADO MUNDIAL DE LA ACUICULTURA	37
II.1.3.1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE ACUICULTURA	37
II.1.3.2. DISTRIBUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN ACUÍCOLA MUNDIAL	39
II.1.3.3. LA ACUICULTURA CONTINENTAL Y MARINA	39
II.1.3.4. ESPECIES PRODUCIDAS	40
II.1.3.5. GRUPOS DE ESPECIES CULTIVADAS SEGÚN LOS PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES	41
II.1.4. LA ACUICULTURA EN LA UNIÓN EUROPEA	42
II.1.5. LA ACUICULTURA EN ESPAÑA	43
II.1.5.1. PRINCIPALES ESPECIES PRODUCIDAS	43
II.1.5.1.1. El rodaballo	44
II.2. PRINCIPALES ICTIOPATOLOGÍAS EN ACUICULTURA Y MEDIDAS PARA SU CONTROL	47
II.2.1. ICTIOPATOLOGÍAS DE ORIGEN VÍRICO	47
II.2.2. ICTIOPATOLOGÍAS DE ORIGEN PARASITARIO	48
II.2.3. ICTIOPATOLOGÍAS DE ORIGEN FÚNGICO	49
II.2.4. ICTIOPATOLOGÍAS DE ORIGEN BACTERIANO	49
II.2.4.1. ICTIOPATOLOGÍAS DE ORIGEN BACTERIANO QUE AFECTAN AL CULTIVO DEL RODABALLO	50
II.2.4.1.1. Vibriosis	50
II.2.4.1.2. Tenacibaculosis	50
II.2.4.1.3. Estreptococosis	51

II.2.4.1.4. Forunculosis	51
II.2.4.1.5. Edwardsiellosis	51
II.2.4.2. MEDIDAS DE CONTROL	52
II.2.4.2.1. Antibióticos	52
II.2.4.2.2. Alternativas al empleo de antibióticos	54
II.2.4.2.2.1. Vacunas e inmunoestimulantes.....	54
II.2.4.2.2.2. Probióticos.....	56
II.2.4.2.2.3. Prebióticos	56
II.2.4.2.2.4. Bacteriófagos	57
II.2.4.2.2.5. Otras alternativas	57
II.3. PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA	58
II.3.1. DEFINICIÓN DE PROBIÓTICOS	58
II.3.2. SELECCIÓN DE PROBIÓTICOS	59
II.3.2.1. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD	60
II.3.2.2. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES Y PROBIÓTICAS (EFICACIA)	60
II.3.2.3. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS.....	61
II.3.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS	61
II.3.3.1. EXCLUSIÓN COMPETITIVA	61
II.3.3.1.1. Producción de compuestos antimicrobianos.....	62
II.3.3.1.2. Competencia por los nutrientes.....	62
II.3.3.1.3. Competencia por los lugares de adhesión.....	62
II.3.3.2. MEJORA DE LA NUTRICIÓN DEL HOSPEDADOR	63
II.3.3.3. MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.....	64
II.3.3.3.1. Citoquinas	64
II.3.3.3.2. Actividad fagocítica.....	65
II.3.3.3.3. Estallido respiratorio	65
II.3.3.3.4. Actividad peroxidasa.....	65
II.3.3.3.5. Lisozima.....	65
II.3.3.3.6. Actividad del complemento.....	66
II.3.3.3.7. Inmunoglobulinas	66
II.3.3.4. MEJORA DE LA CALIDAD DEL AGUA DE CULTIVO	67
II.3.3.5. MEJORA DE LA REPRODUCCIÓN.....	67
II.3.3.6. TOLERANCIA AL ESTRÉS	67
II.3.4. FACTORES QUE AFECTAN A LA EFECTIVIDAD DE LOS PROBIÓTICOS.....	68

II.3.4.1. ORIGEN: MICROORGANISMOS ENDÓGENOS vs. EXÓGENOS.....	68
II.3.4.2. VIABILIDAD: FORMAS VIABLES vs. INACTIVADAS	68
II.3.4.3. MONOCULTIVO (MONOCEPA) vs. CULTIVO MIXTO (MULTICEPAS/ MULTIESPECIES)	69
II.3.4.4. DOSIS DE PROBIÓTICO Y DURACIÓN DE SU ADMINISTRACIÓN.....	69
II.3.4.5. MODO DE ADMINISTRACIÓN	70
II.3.4.5.1. Bioencapsulación: artemias y rotíferos	70
II.3.4.5.2. Adición al agua de cultivo y baño.....	71
II.3.5. PRINCIPALES GRUPOS MICROBIANOS EVALUADOS COMO PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA.....	72
II.3.5.1. BACTERIAS GRAM-POSITIVAS	72
II.3.5.2. BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS.....	73
II.3.5.3. LEVADURAS	79
II.3.5.4. ALGAS UNICELULARES.....	79
II.3.6. PRINCIPALES PREPARACIONES COMERCIALES EMPLEADAS COMO PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA.....	79
II.4. BACTERIAS LÁCTICAS.....	81
II.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS.....	81
II.4.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS	82
II.4.2.1. BACTERIOCINAS: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN	82
II.4.3. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS	86
II.4.3.1. BACTERIAS LÁCTICAS Y ALIMENTOS.....	86
II.4.3.1.1. Aspectos negativos de la presencia de bacterias lácticas en los alimentos	87
II.4.3.2. BACTERIAS LÁCTICAS Y SALUD	88
II.4.3.2.1. Bacterias lácticas como cultivos probióticos	88
II.4.3.2.2. Bacterias lácticas como vacunas orales.....	89
II.4.3.2.3. Bacterias lácticas como productoras de sustancias nutraceuticas	89
II.4.3.3. BACTERIAS LÁCTICAS Y ENFERMEDAD.....	89
II.4.4. BACTERIAS LÁCTICAS EVALUADAS COMO PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA.....	90
II.4.4.1. <i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM MA 18/5.....	92

Capítulo III/Chapter III

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS Y FACTORES DE VIRULENCIA DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO PARA SU EMPLEO COMO PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA

ANTIMICROBIAL ACTIVITY, ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY AND VIRULENCE FACTORS OF LACTIC ACID BACTERIA OF AQUATIC ORIGIN INTENDED FOR USE AS PROBIOTICS IN AQUACULTURE.....95

ABSTRACT97

BACKGROUND97

RESULTS98

Direct antimicrobial activity of the 99 LAB of aquatic origin98

Preliminary safety evaluation of enterococci: presence of virulence factors, production of gelatinase and hemolysin and antibiotic susceptibility.....98

Extracellular antimicrobial activity of the 49 pre-selected LAB..... 104

In vitro safety assessment of the 49 pre-selected LAB..... 104

Hemolysin production, bile salts deconjugation and mucin degradation..... 104

Enzymatic activities 104

Antibiotic susceptibility determined by the broth microdilution test..... 105

Detection of antibiotic resistance genes..... 108

Enzymatic activities 108

DISCUSSION 108

CONCLUSIONS..... 113

METHODS 114

Bacterial strains and growth conditions 114

Direct antimicrobial activity assay..... 114

Extracellular antimicrobial activity assay..... 114

PCR detection of potential virulence factors in enterococci 114

Production of gelatinase by enterococci 115

Production of hemolysin 115

Determination of antibiotic susceptibility 115

Deconjugation of bile salts..... 115

Degradation of mucin 115

Determination of enzymatic activities 116

PCR detection of antibiotic resistance genes..... 116

REFERENCES	116
-------------------------	------------

Capítulo IV/Chapter IV

EVALUACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA PRODUCCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS POR BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE PESCADO Y PRODUCTOS DE LA PESCA

<i>PHENOTYPIC AND GENETIC EVALUATIONS OF BIOGENIC AMINE PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FISH AND FISH PRODUCTS</i>	119
--	------------

<i>ABSTRACT</i>	121
------------------------------	------------

<i>1. INTRODUCTION</i>	121
-------------------------------------	------------

<i>2. MATERIALS AND METHODS</i>	122
--	------------

<i>2.1. Bacterial strains and growth conditions.....</i>	<i>122</i>
--	------------

<i>2.2. Decarboxylase differential growth medium for the screening of HDC, TDC and ODC activities in LAB</i>	<i>122</i>
--	------------

<i>2.3. Thin-layer chromatography (TLC) analysis of histamine, tyramine and putrescine production by LAB.....</i>	<i>122</i>
---	------------

<i>2.4. PCR detection of histidine, tyrosine and ornithine decarboxylase genes in LAB</i>	<i>122</i>
---	------------

<i>2.5. Nucleotide sequence and functional analysis of tdc in the enterococcal strains lacking tyramine production</i>	<i>122</i>
--	------------

<i>2.6. Analysis of the nucleotide sequence surrounding tdc in tdc⁺/TDC⁻ enterococcal strains.....</i>	<i>123</i>
--	------------

<i>3. RESULTS AND DISCUSSION.....</i>	123
--	------------

<i>3.1. Bacterial strains and growth conditions</i>	<i>123</i>
---	------------

<i>3.2. Nucleotide sequence and functional analysis of tdc in E. faecium BCS59 and MV5</i>	<i>123</i>
--	------------

<i>3.3. Analysis of the nucleotide sequence surrounding tdc in E. faecium BCS59 and MV5.....</i>	<i>123</i>
--	------------

<i>REFERENCES</i>	125
--------------------------------	------------

Capítulo V/Chapter V

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Enterococcus faecium* DE ORIGEN ALIMENTARIO MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE) Y DIVERSAS TÉCNICAS MOLECULARES DE TIPIFICACIÓN BASADAS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

<i>SAFETY ASSESSMENT AND MOLECULAR GENETIC PROFILING BY PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE) AND PCR-BASED TECHNIQUES OF Enterococcus faecium STRAINS OF FOOD ORIGIN</i>	127
--	------------

<i>V.1. ABSTRACT</i>	129
-----------------------------------	------------

V.2. INTRODUCTION	129
V.3. MATERIALS AND METHODS	130
V.3.1. Bacterial strains and growth conditions.....	130
V.3.2. PCR detection of virulence markers	131
V.3.3. Determination of ampicillin susceptibility	132
V.3.4. PFGE.....	133
V.3.5. RAPD.....	133
V.3.6. ERIC-PCR.....	133
V.3.7. ARDRA	134
V.3.8. Data analysis	134
V.4. RESULTS	134
V.4.1. PCR detection of virulence markers and determination of ampicillin susceptibility	134
V.4.2. PFGE.....	135
V.4.3. RAPD.....	135
V.4.4. ERIC-PCR.....	137
V.4.5. ARDRA	137
V.5. DISCUSSION	138
V.6. REFERENCES	140

Capítulo VI/Chapter VI

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y EFECTO DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO EN LA PROTECCIÓN DE *Artemia franciscana* FRENTE A *Vibrio campbellii* EMPLEANDO ENSAYOS DE EXPOSICIÓN EN CULTIVOS GNOTOBIÓTICOS

ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND EFFECT OF LACTIC ACID BACTERIA OF AQUATIC ORIGIN ON THE PROTECTION OF <i>Artemia franciscana</i> AGAINST <i>Vibrio campbellii</i> USING GNOTOBIOTIC CHALLENGE TESTS	145
VI.1. ABSTRACT	147
VI.2. INTRODUCTION	148
VI.3. MATERIALS AND METHODS	149
VI.3.1. Bacterial strains and growth conditions.....	149
VI.3.2. Direct antimicrobial activity.....	150
VI.3.3. Extracellular antimicrobial activity	150
VI.3.4. Co-culture assays.....	150

VI.3.5. Survival in seawater.....	151
VI.3.6. Axenic hatching of <i>A. franciscana</i>	151
VI.3.7. <i>A. franciscana</i> gnotobiotic challenge tests	151
VI.3.7.1. Experimental design.....	152
VI.3.8. Statistical analysis	153
VI.4. RESULTS	154
VI.4.1. Antimicrobial activity of LAB from fish, seafood and fish products.....	154
VI.4.2. Co-cultures of LAB and <i>V. campbellii</i>	154
VI.4.3. LAB survival in seawater	154
VI.4.4. <i>A. franciscana</i> gnotobiotic challenge tests	156
VI.5. DISCUSSION	159
VI.6. REFERENCES	162

Capítulo VII/Chapter VII

EFFECTO DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO INACTIVADAS Y VIABLES SOBRE LEUCOCITOS DE RIÑÓN ANTERIOR DE RODABALLO (*Scophthalmus maximus* L.)

DIFFERENT IMPACT OF HEAT-INACTIVATED AND VIABLE LACTIC ACID BACTERIA OF AQUATIC ORIGIN ON TURBOT (<i>Scophthalmus maximus</i> L.) HEAD-KIDNEY LEUCOCYTES	167
ABSTRACT	169
1. INTRODUCTION	169
2. MATERIALS AND METHODS	170
2.1. Fish.....	170
2.2. Bacterial strains and culture conditions	170
2.3. Isolation of head-kidney leucocytes	170
2.4. MTT assay.....	170
2.5. LDH (lactate dehydrogenase) assay	170
2.6. Evaluation of apoptosis by flow cytometry.....	171
2.7. Respiratory burst activity.....	171
2.8. Phagocytosis assay	171
2.9. Statistical analysis	171
3. RESULTS	171
3.1. Evaluation of turbot leucocytes viability by colorimetric assays.....	171

3.2. Leucocyte apoptosis: annexin V and PI staining assay	172
3.3. Respiratory burst activity	173
3.4. Phagocytic activity	173
4. DISCUSSION	173
REFERENCES.....	177

Capítulo VIII/Chapter VIII

EVALUACIÓN *in vitro* E *in vivo* DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO PARA SU EMPLEO COMO PROBIÓTICOS PARA EL CULTIVO DEL RODABALLO (*Scophthalmus maximus* L.)

In vitro AND in vivo EVALUATION OF LACTIC ACID BACTERIA OF AQUATIC ORIGIN AS PROBIOTICS FOR TURBOT (<i>Scophthalmus maximus</i> L.) FARMING.....	181
---	------------

ABSTRACT	183
-----------------------	------------

1. INTRODUCTION	183
------------------------------	------------

2. MATERIALS AND METHODS	184
---------------------------------------	------------

2.1. Bacterial strains and growth conditions.....	184
---	-----

2.2. Fish	184
-----------------	-----

2.3. Direct antimicrobial activity.....	184
---	-----

2.4. Extracellular antimicrobial activity	184
---	-----

2.5. Survival in seawater.....	185
--------------------------------	-----

2.6. Resistance to low pH and turbot bile	185
---	-----

2.7. Cell surface hydrophobicity.....	185
---------------------------------------	-----

2.8. In vitro adhesion to mucus.....	185
--------------------------------------	-----

2.9. In vitro inhibition of pathogen adhesion to mucus.....	185
---	-----

2.10. Challenge test to assess the effects of probiotic administration.....	185
---	-----

2.11. In vivo modulation of immunity-related gene expression.....	186
---	-----

2.12. Isolation of RNA and cDNA synthesis	186
---	-----

2.13. Evaluation of the transcription of immunity-related genes by real-time PCR	186
--	-----

2.14. Statistical analysis.....	186
---------------------------------	-----

3. RESULTS	186
-------------------------	------------

3.1. Antimicrobial activity.....	186
----------------------------------	-----

3.2. Survival in seawater.....	187
--------------------------------	-----

3.3. Resistance to low pH and turbot bile	187
---	-----

3.4. Cell surface hydrophobicity.....	187
---------------------------------------	-----

3.5. In vitro adhesion to mucus	187
3.6. In vitro inhibition of pathogen adhesion to mucus.....	188
3.7. Challenge test to assess the effects of probiotic administration	188
3.8. In vivo modulation of immunity-related gene expression.....	188
4. DISCUSSION	189
REFERENCES	192

Capítulo IX/Chapter IX

DISCUSIÓN INTEGRADORA	195
IX.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO	198
IX.2. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD <i>in vitro</i> DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO	200
IX.2.1. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE FACTORES DE VIRULENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA	201
IX.2.2. DESCONJUGACIÓN DE LAS SALES BILIARES, DEGRADACIÓN DE MUCINA Y EVALUACIÓN DE OTRAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PERJUDICIALES	209
IX.2.3. PRODUCCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS.....	211
IX.2.3.1. Evaluación de la producción de aminos biógenas mediante el empleo de pruebas fenotípicas y genotípicas	212
IX.2.3.2. Secuenciación nucleotídica y análisis funcional del gen <i>tdc</i> en <i>E. faecium</i> BCS59 y MV5.....	214
IX.3. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE <i>E. faecium</i> DE ORIGEN ALIMENTARIO MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE (PFGE) Y DIVERSAS TÉCNICAS BASADAS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	217
IX.4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO PARA LA PROTECCIÓN DE <i>Artemia franciscana</i> FRENTE A <i>Vibrio campbellii</i> MEDIANTE ENSAYOS DE EXPOSICIÓN DE CULTIVOS GNOTOBIÓTICOS (AXÉNICOS)	218
IX.4.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN MEDIO SÓLIDO Y EN COCULTIVOS FRENTE A <i>V. campbellii</i>	220
IX.4.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS PARA SOBREVIVIR EN EL MEDIO ACUÁTICO MARINO Y DE SU EFICACIA PARA LA PROTECCIÓN DE <i>A. franciscana</i> FRENTE A <i>V. campbellii</i> EMPLEANDO ENSAYOS DE EXPOSICIÓN DE CULTIVOS GNOTOBIÓTICOS (AXÉNICOS).....	221

IX.5. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LOS EFECTOS DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO EN LEUCOCITOS DE RIÑÓN ANTERIOR DE RODABALLO (<i>Scophthalmus maximus</i> L.)	224
IX.5.1. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LOS EFECTOS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LA VIABILIDAD DE LEUCOCITOS DE RIÑÓN ANTERIOR DE RODABALLO	225
IX.5.2. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LOS EFECTOS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LA ESTIMULACIÓN DE PARÁMETROS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA DE LEUCOCITOS DE RIÑÓN ANTERIOR DE RODABALLO	227
IX.6. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES Y PROBIÓTICAS DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO PARA SU EMPLEO COMO PROBIÓTICOS PARA EL CULTIVO DEL RODABALLO	229
IX.7. EVALUACIÓN <i>in vivo</i> DE LA SEGURIDAD DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subesp. <i>cremoris</i> SMM69 Y <i>Weissella cibaria</i> P71 Y DE SU EFECTO EN LA MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE DEL RODABALLO	233
 Capítulo X/Chapter X	
CONCLUSIONES	237
CONCLUSIONS	241
 Capítulo XI	
TRABAJO FUTURO	245
 Capítulo XII	
BIBLIOGRAFÍA	251
 Capítulo XIII	
RESUMEN AMPLIADO	297
EXTENDED ABSTRACT	313
 Apéndices	
APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS	331
1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS GENERALES	331
2. ABREVIATURAS DE UNIDADES	335
3. ABREVIATURAS DE GÉNEROS MICROBIANOS	335

4. ABREVIATURAS DE GÉNEROS DE ORGANISMOS ACUÁTICOS	336
5. ABREVIATURAS DE NUCLEÓTIDOS	336
6. ABREVIATURAS Y MASA MOLECULAR DE AMINOÁCIDOS	337
APÉNDICE 2. CÓDIGO GENÉTICO	338
APÉNDICE 3. LISTADO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SECUENCIAS DIANA ESPECÍFICAS	338
APÉNDICE 4. GLOSARIO	339
APÉNDICE 5. LISTADO DE TABLAS	345
APÉNDICE 6. LISTADO DE FIGURAS	346

RESUMEN



Los principales objetivos de este trabajo de investigación fueron los siguientes: (i) determinación *in vitro* de la actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas de peces y de la seguridad de bacterias lácticas (BAL) aisladas de pescado, marisco y productos de la pesca para la evaluación posterior de su empleo como probióticos para el cultivo del rodaballo; (ii) evaluación fenotípica y genética de la producción de aminas biógenas por las BAL de origen acuático; (iii) evaluación de la seguridad *in vitro* y tipificación molecular de cepas de *Enterococcus faecium* de origen alimentario mediante la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE, del inglés *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) y diversas técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*); (iv) evaluación *in vivo* de la eficacia de las BAL de origen acuático para la protección de *Artemia franciscana* frente a *Vibrio campbellii* empleando ensayos de exposición de cultivos gnotobióticos (axénicos); (v) evaluación *in vitro* de los efectos de las BAL inactivadas y viables de origen acuático en leucocitos de riñón anterior de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.); (vi) evaluación *in vitro* de las propiedades funcionales y probióticas de las BAL de origen acuático, y (vii) evaluación *in vivo* de la seguridad y efecto inmunomodulador de *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69 y *Weissella cibaria* P71 como probióticos para el cultivo del rodaballo.

En el Capítulo III se describe la actividad antimicrobiana frente a ictiopatógenos Gram-positivos y Gram-negativos, la susceptibilidad a antibióticos y la prevalencia de factores de virulencia y actividades enzimáticas perjudiciales en 99 BAL (59 del género *Enterococcus* y 40 de otros géneros) aisladas de pescado, marisco y productos de la pesca. Los resultados obtenidos revelaron que todas las BAL tenían actividad antimicrobiana directa frente a, al menos, cuatro de los ocho ictiopatógenos evaluados empleando la técnica de inhibición por siembra en picadura (ISP). La evaluación inicial de la seguridad de los 59 enterococos (21 *Enterococcus faecalis* y 38 *Enterococcus faecium*) se llevó a cabo por la detección de factores de virulencia, el análisis de la producción de actividades hemolítica y gelatinasa y la susceptibilidad a diversos antibióticos de importancia clínica en medicina humana y veterinaria empleando la técnica de disco sobre agar. Con respecto a *E. faecalis*, el análisis mediante PCR mostró que la mayoría de las cepas (20 cepas, 95%) presentó, al menos, el gen que codifica un factor de virulencia relevante: antígeno de endocarditis de *E. faecalis* (*efaAfs*; 20 cepas, 95%), gelatinasa (*gelE*; 15 cepas, 71%) o sustancia de agregación (*agg*; 14 cepas, 67%). Con respecto a *E. faecium*, 20 cepas (53%) presentaron, al menos, un factor de virulencia de relevancia: *efaAfs* (17 cepas, 45%), *gelE* (9 cepas, 24%) o *agg* (3 cepas, 8%). La actividad gelatinasa se detectó en cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* (71 y 11%, respectivamente), mientras que un bajo número de *E. faecalis* (1 cepa; 5%) y ningún *E. faecium* presentó actividad hemolítica. Ninguno de los enterococos amplificó los genes *hyl* o *esp* que codifican una hipotética glicosil hidrolasa y una proteína de superficie de los enterococos, respectivamente. Los resultados del ensayo de susceptibilidad a antibióticos revelaron que 39 enterococos (66%) mostraron resistencia adquirida a antibióticos. A este respecto, 13 cepas de *E. faecalis* (62%) mostraron resistencia adquirida a (i) quinolonas de segunda generación (ciprofloxacino

y/o norfloxacino) (12 cepas, 57%), (ii) rifampicina (5 cepas, 24%), (iii) nitrofurantoina (5 cepas, 24%), (iv) glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) (4 cepas, 19%), y/o (v) eritromicina (1 cepa, 5%). Sin embargo, 26 cepas de *E. faecium* (68%), mostraron resistencia adquirida a (i) eritromicina (14 cepas, 37%), (ii) nitrofurantoina (11 cepas, 29%), (iii) quinolonas de segunda generación (ciprofloxacino y/o norfloxacino) (10 cepas, 26%), (iv) rifampicina (4 cepas, 11%), (v) tetraciclina (2 cepas, 5%), y/o (vi) glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) (1 cepa, 3%). Además, se encontraron múltiples resistencias (dos a seis antibióticos) en *E. faecalis* (10 cepas, 48%) y, en menor medida, en *E. faecium* (12 cepas, 32%). De acuerdo con los resultados citados anteriormente, 21 cepas (100%) de *E. faecalis* se descartaron para posteriores estudios por la presencia de factores de virulencia (8 cepas, 38%), resistencias a antibióticos adquiridas (1 cepa, 5%) o ambos fenotipos (12 cepas, 57%). Con respecto a *E. faecium*, 29 cepas (76%) se descartaron por la presencia de factores de virulencia (3 cepas, 8%), resistencias a antibióticos adquiridas (9 cepas, 24%) o ambos fenotipos (17 cepas, 45%). Estos resultados permitieron seleccionar 9 *E. faecium* para su posterior evaluación. La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de 49 BAL preseleccionadas (9 cepas de *E. faecium* seleccionadas por su seguridad inicial y el resto de las 40 cepas no enterococales) con actividad antimicrobiana directa frente a ictiopatógenos se evaluó frente a tres microorganismos mediante la técnica de difusión en agar (TDA). A este respecto, 24 cepas (49%) secretaron sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica y termorresistentes (*i.e.*, bacteriocinas) en sus sobrenadantes libres de células. Las 49 BAL preseleccionadas se sometieron a una evaluación completa de su seguridad empleando diferentes ensayos *in vitro*. Se detectaron resistencias a antibióticos en los géneros *Weissella* (60%), *Pediococcus* (44%) y *Lactobacillus* (33%), pero no en los géneros *Leuconostoc* ni *Lactococcus*, empleando un ensayo de microdilución. La presencia de genes de resistencia a antibióticos se detectó por PCR en el 7,5% de las cepas no enterococales, incluyendo cepas del género *Pediococcus* (12,5%) y *Weissella* (6,7%). Una cepa de la especie *Pediococcus pentosaceus* y otra de la especie *Weissella cibaria* presentaron el gen *mef(A/E)* que confiere resistencia a la eritromicina y otras dos cepas de *P. pentosaceus* presentaron el gen *lnu(A)* que confiere resistencia a las lincosamidas. Esta es la primera descripción del gen *mef(A/E)* en los géneros *Pediococcus* y *Weissella*, así como de *lnu(A)* en el género *Pediococcus*. Ninguna de las 49 BAL evaluadas desconjugó las sales biliares, ni mostró actividad mucinolítica u otras actividades enzimáticas perjudiciales. El protocolo *in vitro* desarrollado en este trabajo constituye una estrategia efectiva como método de preselección a gran escala de BAL potencialmente seguras para su empleo como probióticos en acuicultura.

En el Capítulo IV se describe la evaluación de la producción de aminas biógenas (histamina, tiramina y putrescina) por 74 BAL de origen acuático, que se llevó a cabo empleando los siguientes métodos fenotípicos y genotípicos: (i) detección de la descarboxilación de aminoácidos en un medio diferencial en placas de cultivo; (ii) detección de las aminas biógenas por cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin-Layer Chromatography*), y (iii) detección de los genes que codifican la síntesis

de las correspondientes enzimas descarboxilasas por PCR. Ninguna de las cepas evaluadas presentó actividades histidina y ornitina descarboxilasa, ni los genes que codifican la producción de las respectivas enzimas; sin embargo, todos los enterococos presentaron el gen que codifica la tirosina descarboxilasa (*tdc*), detectándose esta actividad enzimática en todos ellos excepto *E. faecium* BCS59 y *E. faecium* MV5. El análisis del operón de la tirosina descarboxilasa de estas cepas reveló la presencia de una secuencia de inserción integrada en la región promotora de *tdc* que impediría la transcripción de este gen y, por tanto, la producción de esta enzima.

En el Capítulo V se describe la evaluación de la seguridad de 14 cepas de *E. faecium* de origen alimentario potencialmente probióticas de acuerdo con la guía propuesta por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Empleando la técnica de PCR se determinó que ninguno de los enterococos presenta los genes *esp*, *hyl_{Efm}* y el elemento genético móvil *IS16*. Todas las cepas fueron susceptibles a la ampicilina ($MIC \leq 2$ mg/l) mediante el test de microdilución. Además, en este trabajo se determinó la relación genética los enterococos mediante PFGE y diversas técnicas moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante la técnica de PCR, concretamente amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD, del inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*), amplificación por PCR de secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (ERIC-PCR, del inglés *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*) y análisis de los patrones de restricción del ADN ribosómico amplificado por PCR (ARDRA, del inglés *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). El análisis de los patrones obtenidos con la técnica PFGE, empleando la enzima *Sma*I, permitió identificar cuatro subgrupos, a diferencia del análisis con las técnicas RAPD y ERIC-PCR que revelaron nueve y ocho subgrupos, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que ERIC-PCR permitió obtener el mayor índice de diversidad, seguido de RAPD y PFGE, mientras que por ARDRA se observó el valor más bajo. En este trabajo se muestra la ausencia de marcadores de virulencia en una colección de 14 cepas de *E. faecium* de origen alimentario con actividad antimicrobiana, sugiriendo que estas cepas son seguras para su empleo en la industria alimentaria o como probióticos en producción animal, y que la técnica de ERIC-PCR es una herramienta eficaz para el genotipado de enterococos potencialmente probióticos.

En el Capítulo VI se describe la actividad antimicrobiana de 33 BAL frente al patógeno *V. campbellii*, la inhibición de este patógeno en cocultivos, la supervivencia en agua y el efecto *in vivo* de BAL inactivadas por calor y viables en la protección de *A. franciscana* frente a este patógeno empleando diferentes ensayos de cultivos gnotobióticos (axénicos). Empleando el medio de cultivo TSA (del inglés *Tryptone Soya Agar*) suplementado con glucosa (TSA-G; 0,25 y 0,60%, p/v), la mayoría de las BAL (72,7 y 93,9%, respectivamente) presentaron actividad antimicrobiana frente a *V. campbellii* LMG21363. Después de 24 h de incubación en cocultivo, 26 de las 33 BAL presentaron actividad bactericida frente a *V. campbellii* LMG21363. A este respecto, 21 de las 33 BAL (63,3%) inhibieron totalmente el desarrollo de *V. campbellii* LMG21363 (disminución de 5–6 log), mientras

que cinco de las 33 BAL (15,2%) redujeron significativamente los recuentos de este patógeno (disminución de 2–4 log). Además, todas las BAL sobrevivieron en medio acuático marino a 28 °C durante 48 h. En los ensayos de cultivos gnotobióticos, sólo los tratamientos con las cepas *E. faecium* CV1 inactivada (54%) y viable (48%) y *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* SMF161 inactivada (54%) mejoraron la supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* frente a *V. campbellii* en agua de mar filtrada y autoclavada (121 °C, 15 min) (experimento 1) con respecto a los nauplios sin tratar con las BAL (24%) ($p < 0,05$). Cuando se evaluó el efecto de las BAL en agua de mar filtrada y autoclavada suplementada con glucosa (experimento 2), la mortalidad de *A. franciscana* aumentó, siendo el efecto dosis-dependiente debido a la ausencia de oxígeno originada por el metabolismo oxidativo de la glucosa por *V. campbellii*. Cuando se determinó el efecto de las BAL en agua marina filtrada y autoclavada suplementada con caldo MRS (*de Man, Rogosa and Sharpe*) (experimento 3), ninguna BAL mostró efecto perjudicial para *A. franciscana*. Además, la cepa *L. cremoris* SMF161 inactivada ejerció un efecto positivo en la supervivencia de artemia cuando los nauplios se cultivaron en presencia de MRS y fueron infectados con *V. campbellii* ($p < 0,05$). En el experimento 4 se evaluó el efecto de diversas combinaciones de BAL para proteger a *A. franciscana* en agua de mar filtrada y autoclavada, observándose que sólo uno de los cinco grupos de BAL evaluados, en el que se incluían las cepas *E. faecium* CV1 y *L. cremoris* SMF161, mejoró la supervivencia de *A. franciscana* empleando las formas inactivadas y viables de las bacterias (42 y 40,7%, respectivamente) ($p < 0,05$). En conclusión, nuestros resultados sugieren que *E. faecium* CV1 y *L. cremoris* SMF161 podrían mejorar el estatus nutricional de artemia y/o que alguna(s) molécula(s) podría(n) estimular la respuesta inmune innata de *A. franciscana* y mejorar su supervivencia frente a *V. campbellii*, aunque sería necesario realizar más estudios utilizando mejores condiciones nutricionales (e.g., suplementación con levadura) en el cultivo de artemia para mejorar los efectos probióticos de las BAL en relación a la protección de este crustáceo frente a este ictiopatógeno.

En el Capítulo VII se describe el efecto de ocho BAL inactivadas por calor y viables de origen acuático (*E. faecium* CV1, *E. faecium* LPP29, *Lactobacillus curvatus* subesp. *curvatus* BCS35, *L. cremoris* SMF110, *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69, *P. pentosaceus* SMM73, *P. pentosaceus* TPP3 y *W. cibaria* P71) en la viabilidad y respuesta inmune innata de leucocitos de riñón anterior de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). A este respecto, los leucocitos de rodaballo se incubaron con las BAL inactivadas y viables a diferentes concentraciones. Después de la incubación, la viabilidad de los leucocitos se evaluó empleando ensayos colorimétricos (MTT [bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio] y LDH [lactato deshidrogenasa]) y un ensayo de detección de anexina V/ioduro de propidio (IP) empleando citometría de flujo. Las BAL inactivadas no mostraron efecto citotóxico sobre los leucocitos de rodaballo, mientras que sus formas viables ejercieron distintos efectos en la apoptosis de linfocitos y fagocitos de esta especie acuícola. Las BAL viables estimularon el estallido respiratorio y la fagocitosis de los leucocitos más eficientemente que sus formas

inactivadas. Los resultados descritos indican la existencia de diversos mecanismos de interacción cepa-específicos entre las BAL evaluadas y los leucocitos de rodaballo. Asimismo, en este trabajo se desarrolló un sistema eficaz de ensayos *in vitro* para evaluar los efectos inmunomoduladores de BAL, el cual resulta de utilidad para la identificación y preselección de BAL potencialmente probióticas.

En el Capítulo VIII se describe el potencial *in vitro* e *in vivo* de las ocho BAL citadas anteriormente como probióticos para el cultivo del rodaballo. Todas las BAL excepto *Lb. curvatus* BCS35 mostraron actividad antimicrobiana frente a, al menos, cuatro cepas de *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio splendidus*. Además, todas las BAL sobrevivieron en el medio acuático marino a 18 °C durante 7 días y toleraron valores de pH 3,0 y bilis de rodaballo (10%, v/v); sin embargo, difirieron en la hidrofobicidad de su superficie celular (8,2–21,7%) y en su capacidad de adhesión al mucus de piel (1,2–21,7%) e intestino (0,7–2,1%) de rodaballo. La mayoría de las cepas evaluadas inhibió la adhesión de los ictiopatógenos al mucus de rodaballo. Con base en los resultados descritos anteriormente, se seleccionaron las cepas *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 por su actividad antimicrobiana frente a *T. maritimum* y *V. splendidus*, sus adecuadas propiedades funcionales y sus diferencias en la capacidad de adhesión al mucus e inhibición de la adhesión de patógenos al mucus de rodaballo. Estas dos cepas fueron inocuas cuando se administraron por baño a las larvas y juveniles de rodaballos. Además, el análisis por PCR en tiempo real de la transcripción de los genes relacionados con la inmunidad que codifican la interleuquina 1- β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), lisozima, complemento (C3), complejo mayor de histocompatibilidad-I α (MHC-I α) y complejo mayor de histocompatibilidad-II α (MHC-II α) en cinco órganos (riñón anterior, bazo, hígado, intestino y piel) reveló la capacidad de estas BAL para estimular su expresión, especialmente la de los genes relacionados con la inmunidad inespecífica en los tejidos mucosos de juveniles de rodaballo. Los resultados de este trabajo demuestran la idoneidad de *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 como probióticos para el cultivo del rodaballo.

ABSTRACT

The main goals addressed in the present research work were the following: (i) *in vitro* assessment of the antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and safety of Lactic Acid Bacteria (LAB) isolated from fish, seafood and fish products intended for use as probiotics in aquaculture; (ii) phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by LAB of aquatic origin; (iii) safety assessment and molecular genetic profiling by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and three polymerase chain reaction (PCR)-based techniques of *Enterococcus faecium* strains of food origin; (iv) *in vivo* evaluation of the effects of LAB of aquatic origin on the protection of *Artemia franciscana* against *Vibrio campbellii* using gnotobiotic (axenic) challenge tests; (v) *in vitro* evaluation of the effects of heat-inactivated and viable LAB of aquatic origin on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) head-kidney leucocytes; (vi) *in vitro* evaluation of the functional and probiotic properties of LAB of aquatic origin, and *in vivo* evaluation of the safety and immunomodulatory effects of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* SMM69 and *Weissella cibaria* P71 as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming.

In Chapter III, the antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative fish pathogens, the antibiotic susceptibility, and the prevalence of virulence factors and detrimental enzymatic activities in 99 LAB (59 enterococci and 40 non-enterococci) isolated from fish, seafood and fish products is described. The obtained results revealed that all LAB displayed direct antimicrobial activity against, at least, four of the eight tested indicator microorganisms using a stab-on-agar test (SOAT). Preliminary safety evaluation of the 59 enterococci (21 *Enterococcus faecalis* and 38 *Enterococcus faecium*) was carried out by detection of potential virulence factors, analysis of hemolysin and gelatinase production, and susceptibility testing to several antibiotics of relevance for human and veterinary medicine by disk diffusion test. Concerning *E. faecalis*, the analysis by PCR showed that most of the strains (20 strains, 95%) harboured, at least, one relevant virulence factor: *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen (*efaAfs*; 20 strains, 95%), gelatinase (*gelE*; 15 strains, 71%), or aggregation substance (*agg*; 14 strains, 67%). With regard to *E. faecium*, 20 strains (53%) harboured, at least, one relevant virulence factor: *efaAfs* (17 strains, 45%), *gelE* (9 strains, 24%) or *agg* (3 strains, 8%). Gelatinase activity was found in *E. faecalis* and *E. faecium* (71 and 11%, respectively), while a low number of *E. faecalis* (1 strain, 5%) and none *E. faecium* exerted hemolytic activity. None of the enterococci amplified *hyl* or *esp* genes encoding a putative glycosyl hydrolase and the enterococcal surface protein, respectively. The results of the antibiotic susceptibility tests revealed that 39 enterococcal strains (66%) displayed acquired antibiotic resistance. In this respect, 13 *E. faecalis* strains (62%) showed acquired resistance to (i) second generation quinolones (ciprofloxacin and/or norfloxacin) (12 strains, 57%), (ii) rifampicin (5 strains, 24%), (iii) nitrofurantoin (5 strains, 24%), (iv) glycopeptides (vancomycin and teicoplanin) (4 strains, 19%), and/or (v) erythromycin (1 strain, 5%). However, 26 *E. faecium* strains (68%) displayed acquired resistance to (i) erythromycin (14 strains, 37%), (ii) nitrofurantoin (11 strains, 29%), (iii) second generation quinolones (ciprofloxacin and/or

norfloxacin) (10 strains, 26%), (iv) rifampicin (4 strains, 11%), (v) tetracycline (2 strains, 5%), and/or (vi) glycopeptides (vancomycin and teicoplanin) (1 strain, 3%). Moreover, multiple antibiotic resistance (two to six antibiotics) was found in *E. faecalis* (10 strains, 48%) and, to a lesser extent, in *E. faecium* (12 strains, 32%). According to the results above, 21 *E. faecalis* strains (100%) were discarded for further studies based on the presence of virulence factors (8 strains, 38%), acquired antibiotic resistance (1 strain, 5%) or both (12 strains, 57%). Regarding *E. faecium* strains, 29 (76%) were eliminated from further screening based on acquired antibiotic resistance (9 strains, 24%), the presence of virulence factors (3 strains, 8%) or both (17 strains, 45%). Overall, these results allowed the selection of 9 *E. faecium* strains for further evaluation. The antimicrobial activity of supernatants from the 49 pre-selected LAB (9 *E. faecium* selected based on their preliminary safety assessment and the remaining 40 non-enterococcal strains) with direct antimicrobial activity against fish pathogens was assayed against three indicator microorganisms by an agar well-diffusion test (ADT). In this regard, 24 (49%) strains secreted heat-stable proteinaceous antimicrobial substances (*i.e.*, bacteriocins) in their cell-free culture supernatants. The 49 pre-selected LAB were further subjected to a comprehensive safety assessment by different *in vitro* tests. Safety concerns based on antibiotic resistance determined by a broth microdilution test were found in the genera *Weissella* (60%), *Pediococcus* (44%) and *Lactobacillus* (33%), but not in leuconostocs and lactococci. Antibiotic resistance genes, analyzed by PCR, were found in 7.5% of the non-enterococci, including the genera *Pediococcus* (12.5%) and *Weissella* (6.7%). One strain of both *Pediococcus pentosaceus* and *Weissella cibaria* carried the erythromycin resistance gene *mef*(A/E), and another two *P. pentosaceus* strains harboured *lnu*(A) conferring resistance to lincosamides. This is the first description of *mef*(A/E) in the genera *Pediococcus* and *Weissella*, and of *lnu*(A) in the genus *Pediococcus*. None of the strains (enterococci and non-enterococci) showed bile deconjugation and mucin degradation abilities, or other detrimental enzymatic activities. The *in vitro* subtractive screening presented in this work constitutes a valuable strategy for the large-scale preliminary selection of putatively safe LAB intended for use as probiotics in aquaculture.

In Chapter IV, biogenic amine production (histamine, tyramine and putrescine) by a collection of 74 LAB of aquatic origin was investigated by means of: (i) amino acid decarboxylation by growth on decarboxylase differential medium; (ii) biogenic amine detection by thin-layer chromatography (TLC), and (iii) decarboxylase genes detection by PCR. None of the tested strains showed neither production of histamine and putrescine, nor presence of the genetic determinants encoding the corresponding decarboxylase activities. However, the tyrosine decarboxylase gene (*tdc*) was present in all the enterococcal strains, and tyramine production was detected by TLC in all of them but *E. faecium* BCS59 and *E. faecium* MV5. Analysis of the tyrosine decarboxylase operon of these strains revealed the presence of an insertion sequence upstream *tdc* that could be responsible for their lack of tyrosine decarboxylase activity.

In Chapter V, the safety of 14 potential probiotic *E. faecium* strains isolated from food was investigated following the guidance proposed by the European Food Safety Agency (EFSA). As shown by PCR, none of the enterococci harboured the genes *esp* and *hyl_{Efm}*, and the mobile insertion sequence *IS16*. All strains were susceptible to ampicillin ($\text{MIC} \leq 2 \text{ mg/L}$) by microdilution test. Moreover, the diversity and genetic relatedness of these enterococci were determined using molecular genotyping techniques such as PFGE and three PCR-based typing methods, namely random amplified polymorphic DNA (RAPD), enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) and restriction analysis of amplified *16S rDNA* (ARDRA). PFGE analysis of *SmaI* macrorestriction patterns evidenced four subgroups in contrast with RAPD and ERIC-PCR analysis that gave nine and eight different subgroups, respectively. The results showed that ERIC-PCR yielded the highest diversity index, followed by RAPD and PFGE, while ARDRA achieved the lowest diversity value. This work demonstrates the absence of several well-known enterococcal virulence markers in a collection of *E. faecium* strains with antimicrobial activity, which renders them safe to be used in the food industry or as probiotics in animal production, as well as that ERIC-PCR is a reliable tool for the molecular genetic profiling of potential probiotic enterococci.

In Chapter VI, the antimicrobial activity of LAB against the pathogen *V. campbellii*, the growth inhibition of this pathogen in co-cultures, the seawater survival, and the *in vivo* effect of heat-inactivated and viable LAB on the protection of *A. franciscana* against *V. campbellii* using four different gnotobiotic (axenic) challenge tests is described. From a total of 33 LAB, 24 (72.7%) and 31 (93.9%) exerted antimicrobial activity against *V. campbellii* LMG21363 in Tryptone Soya Agar (TSA) supplemented with glucose (0.25 and 0.60%, w/v, respectively). After 24 h of incubation in co-culture, 26 out of 33 LAB were bactericidal against *V. campbellii* LMG21363. Namely, 21 out of 33 LAB (63.3%) totally inhibited the growth of *V. campbellii* LMG21363 (5–6 log decrease), while five out of 33 LAB (15.2%) reduced significantly the counts of this pathogen (2–4 log decrease). Moreover, all LAB survived in seawater at 28 °C for 48 h. In the gnotobiotic challenge tests, only heat-inactivated (54%) and viable *E. faecium* CV1 (48%) and heat-inactivated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMF161 (54%) significantly enhanced the survival of the infected nauplii in filtered (0.22 µm) and autoclaved (121 °C, 15 min) seawater (FASW) (experiment 1) with respect to infected nauplii in the absence of LAB (24%) ($p < 0.05$). When the effect of LAB was evaluated in FASW supplemented with glucose (experiment 2), *A. franciscana* mortality increased in a glucose concentration-dependent manner in all infected animals, probably due to the oxygen starvation caused by the oxidative metabolism of glucose by *V. campbellii*. When the effect of LAB was evaluated in FASW supplemented with de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (experiment 3), none of the LAB showed a detrimental effect on *A. franciscana*. Moreover, only heat-inactivated *L. cremoris* SMF161 showed a positive effect on *A. franciscana* survival when nauplii were previously cultured with this strain in FASW supplemented with MRS and then infected with *V. campbellii* ($p < 0.05$). In the experiment 4,

the effect of different LAB grouped in pools on the protection of *A. franciscana* was determined in FASW. Only one out of the five groups of heat-inactivated or viable LAB, in which the strains *E. faecium* CV1 and *L. cremoris* SMF161 were included, improved *A. franciscana* survival (42 and 40.7%, respectively; $p < 0.05$). In conclusion, our data suggest that *E. faecium* CV1 and *L. cremoris* SMF161 could improve artemia nutritional status and/or that some molecule(s) could stimulate the innate immune response of *A. franciscana* and enhance its survival against *V. campbellii*, although further studies need to be carried out using improved *A. franciscana* nutrition conditions (e.g., by supplementation with yeast) in an attempt to enhance LAB probiotic effects related to the protection of *A. franciscana* against this pathogen.

In Chapter VII, the *in vitro* effects of eight heat-inactivated and viable LAB of aquatic origin (*E. faecium* CV1, *E. faecium* LPP29, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* BCS35, *L. cremoris* SMF110, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* SMM69, *P. pentosaceus* SMM73, *P. pentosaceus* TPP3 and *W. cibaria* P71) on the viability and innate immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) leucocytes were assessed. In this sense, turbot head-kidney leucocytes were incubated with viable and heat-inactivated LAB at different concentrations. After incubation, the viability of leucocytes was evaluated using colorimetric methods (MTT [3-[4,5-dimethylthiazolyl-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide] and LDH [lactate dehydrogenase]) and a double staining flow cytometric assay (annexin V/propidium iodide). Heat-inactivated LAB showed no cytotoxic effect while viable LAB exerted a variable influence on apoptosis of turbot phagocytes and lymphocytes. Leucocyte respiratory burst activity and phagocytosis were also differentially activated, as viable LAB stimulated leucocytes more efficiently than the heat-inactivated LAB. Our results suggest the presence of diverse strain-specific mechanisms of interaction between the evaluated LAB and turbot leucocytes. Furthermore, this work sets up *in vitro* systems to evaluate the effect of LAB, which will be useful to develop efficient screening strategy for the selection of potential probiotic LAB.

In Chapter VIII, the *in vitro* and *in vivo* potential of the eight LAB cited above as turbot probiotics is described. Seven out of the eight LAB exerted direct antimicrobial activity against, at least, four strains of *Tenacibaculum maritimum* and *Vibrio splendidus*. All LAB survived in seawater at 18 °C for 7 days, and withstood exposure to pH 3.0 and 10% (v/v) turbot bile; however, they differed in cell surface hydrophobicity (8.2–21.7%) and in their ability to adhere to turbot skin (1.2–21.7%) and intestinal (0.7–2.1%) mucus. Most of the tested strains inhibited the binding of turbot pathogens to the mucus. *Lc. cremoris* SMM69 and *W. cibaria* P71 were selected based on their strong antimicrobial activity against *T. maritimum* and *V. splendidus*, good functional properties, and different adhesion ability to skin mucus and ability to inhibit the adhesion of turbot pathogens to mucus. These two LAB strains were harmless when administered by bath to turbot larvae and juveniles; moreover, real-time PCR on the transcription levels of the immunity-related genes encoding interleukin-1 β (IL-1 β), tumour necrosis factor- α (TNF- α), lysozyme, complement (C3), major histocompatibility complex I- α (MHC-

I α) and major histocompatibility complex II- α (MHC-II α) in five organs (head-kidney, spleen, liver, intestine and skin) revealed the ability of these LAB to stimulate their expression in turbot juveniles, especially the non-specific immunity associated genes in mucosal tissues. Based on our results, *Lc. cremoris* SMM69 and *W. cibaria* P71 may be considered as suitable probiotic candidates for turbot farming.

CAPÍTULO I

**Exposición general del problema a investigar:
objetivos**

En la actualidad, la pesca extractiva parece haber alcanzado su cota máxima debido a la sobreexplotación de los recursos pesqueros y a la ausencia de nuevos caladeros, por lo que la acuicultura se perfila como la única posibilidad de que pueda cubrirse la creciente demanda mundial de pescado en el futuro (FAO, 2010). Uno de los principales retos a los que se enfrenta la acuicultura moderna para ofrecer un suministro suficiente y constante de productos de calidad y seguros es la prevención y el control de las ictiopatologías, especialmente las de etiología bacteriana que se presentan durante las etapas larvaria y de alevinaje, que provocan importantes mermas en la producción (Toranzo *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2009). Tradicionalmente se han utilizado los antibióticos (en muchas ocasiones de forma indiscriminada) como agentes terapéuticos y, en algunos casos, en los tratamientos profilácticos de las ictiopatologías bacterianas; no obstante, cada vez existe una mayor reticencia a su empleo, no sólo por parte de las agencias sanitarias sino también por las propias piscifactorías y los consumidores debido a sus posibles efectos perjudiciales para la salud animal y humana, la seguridad alimentaria y el medio ambiente (FAO, 2005; Cabello, 2006; EFSA, 2008b). Por todo ello en la mayoría de los países industrializados se han desarrollado regulaciones cada vez más restrictivas sobre el empleo de antibióticos en acuicultura, que incluyen, por ejemplo, la prohibición de su empleo como tratamiento profiláctico, la restricción del número de antibióticos autorizados, el control de su prescripción veterinaria, el establecimiento y vigilancia de límites máximos de residuos (LMR) y la prohibición expresa del empleo de determinados antibióticos por su elevada toxicidad o por su importancia en medicina humana y su capacidad para generar resistencias (FAO, 2005; Cabello, 2006; EFSA, 2008a, 2008b). A este respecto, aunque la vacunación constituye, en principio, el método ideal para la prevención de estas ictiopatologías, su aplicación en acuicultura resulta dificultada por su disponibilidad, grado de protección que confiere, coste, ineficacia en las etapas larvarias, retardo del crecimiento, limitación de su eficacia cuando existen otras enfermedades o cuando no se emplean inmunoestimulantes, alteraciones en la calidad del producto (*e.g.*, adherencias, inflamación crónica y melanosis), y, por último, el estrés que su empleo provoca en los peces, especialmente cuando se administran mediante inyección intraperitoneal, con la consiguiente repercusión en su respuesta inmune y, por lo tanto, en su productividad (EFSA, 2008a; Subasinghe, 2009; Toranzo *et al.*, 2009). En consecuencia, cada vez es mayor el interés por la investigación y el desarrollo de metodologías alternativas o complementarias a la quimioterapia y la vacunación que sean eficaces, seguras, sencillas, rentables económicamente y respetuosas con el medio ambiente. En este contexto, está adquiriendo una creciente relevancia el empleo de probióticos (Verschuere *et al.*, 2000b; Irianto y Austin, 2002; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010a; Merrifield *et al.*, 2010b; Defoirdt *et al.*, 2011; Dimitroglou *et al.*, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014), que son cultivos microbianos vivos que ejercen un efecto beneficioso en el hospedador mediante: (i) la modificación de su microbiota y/o la de su medio ambiente; (ii) el incremento de la eficiencia en la asimilación del alimento y/o su valor nutritivo; (iii) el incremento de su resistencia frente a las enfermedades; (iv) la mejora de su respuesta al estrés y su vigor, y/o (v) el incremento de la calidad del

medio ambiente acuático en el que se desarrolla (Verschuere *et al.*, 2000b). Con base en esta definición, los probióticos pueden incluir cultivos microbianos que: (i) previenen la adhesión y proliferación de microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal y las mucosas superficiales de los animales acuáticos, en las superficies de las piscifactorías y en el ambiente de cultivo; (ii) compiten eficazmente por los nutrientes disponibles; (iii) producen sustancias antimicrobianas; (iv) aseguran un aprovechamiento óptimo del alimento mediante su ayuda a la digestión (estimulación del crecimiento); (v) mejoran la calidad del agua, y/o (vi) estimulan la respuesta inmune (Verschuere *et al.*, 2000b; Balcázar *et al.*, 2006; Vine *et al.*, 2006; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al.*, 2010b). En este contexto, los principales mecanismos de acción por los que los probióticos ejercen su efecto beneficioso incluyen los siguientes: (i) supresión de microorganismos patógenos mediante exclusión competitiva mediada por la producción de uno o varios compuestos antimicrobianos bactericidas o bacteriostáticos (*e.g.*, bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, lisozima, amonio y diacetilo) y sideróforos (*e.g.*, de hierro), por la competencia por los nutrientes y la energía disponibles y/o por la competencia por los sitios de adhesión del intestino u otras superficies mucosas; (ii) mejora de la nutrición del hospedador debida al suministro de nutrientes (*e.g.*, ácidos grasos, vitaminas, poliaminas y aminoácidos esenciales) y/o favorecimiento de la digestión (*e.g.*, producción de lipasas, amilasas y proteasas); (iii) estimulación de la respuesta inmune local y sistémica del hospedador (*e.g.*, activación de la respuesta humoral, incremento de la actividad fagocítica y respiratoria, modulación de la proliferación y diferenciación celular, producción de lisozima, peroxidasa y proteasas, activación del complemento y producción de citoquinas), mediada por diversos componentes de la pared celular (*i.e.*, lipopolisacáridos, peptidoglicanos y β -glucanos), y, por último, (iv) incremento de la calidad del agua de cultivo (*e.g.*, conversión de materia orgánica en CO₂ y reducción de los niveles de amonio o nitritos) (Verschuere *et al.*, 2000b; Balcázar *et al.*, 2006, 2007b; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010a; Merrifield *et al.*, 2010b; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). La mayoría de los probióticos propuestos para su empleo en acuicultura pertenecen al grupo de las bacterias lácticas (principalmente *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., y *Pediococcus* spp.), a los géneros *Bacillus*, *Vibrio* y *Pseudomonas* y a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Verschuere *et al.*, 2000b; Chabrillón *et al.*, 2007; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010a; Dimitroglou *et al.*, 2011). Aunque las bacterias lácticas no constituyen la microbiota intestinal predominante de los peces, forman parte de la misma en muchos peces cultivados (Ringø *et al.*, 2000, 2010a; Ringø y Holzapfel, 2000; Irianto y Austin, 2002; Gatesoupe, 2008; Desriac *et al.*, 2010), lo que avala su empleo como probióticos para la acuicultura (Verschuere *et al.*, 2000b; Chabrillón *et al.*, 2007; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al.*, 2010b). Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas son la competencia por nutrientes, la formación de ácidos orgánicos (ácidos láctico y acético) y la producción de sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica o proteica y síntesis ribosomal denominadas bacteriocinas (Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). Considerando que la mayoría de las bacterias lácticas son seguras para el consumo animal y humano (estatus GRAS, del

inglés *Generally Recognized As Safe*, establecido por la Agencia de Alimentos y Medicamentos [FDA] de EE.UU., o su equivalente europeo, estatus QPS, del inglés *Qualified Presumption of Safety*, establecido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA]) (EFSA, 2005a, 2005b, 2007) y que algunas cepas productoras de bacteriocinas (bacteriocinogénicas) inhiben a microorganismos patógenos responsables de infecciones humanas y animales y de reducir la productividad animal, se ha sugerido su empleo como probióticos tanto en personas como en animales de explotación para reducir el uso de antibióticos (Ryan *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1999; Kirkup, 2006; Gatesoupe, 2008; Gillor *et al.*, 2008; Millette *et al.*, 2008; Sang y Blecha, 2008).

Con base en lo expuesto anteriormente, este trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos globales: (i) evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas, aisladas previamente por nuestro grupo de investigación de pescado, marisco y productos de la pesca, frente a bacterias patógenas de los peces; (ii) evaluación de su seguridad *in vitro* y tipificación molecular; (iii) evaluación *in vitro* de su capacidad inmunoestimuladora y propiedades funcionales; (iv) evaluación *in vivo* de su efecto en la protección de *Artemia franciscana* frente a *Vibrio campbellii*, y, por último, (v) evaluación *in vivo* de su seguridad para el rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) y de su capacidad para modular la expresión de genes de inmunidad en esta especie acuícola marina de gran interés comercial para España. Conviene destacar que aunque actualmente no existen directrices nacionales o internacionales específicas acerca de la evaluación de probióticos para su empleo en la acuicultura, la planificación y el desarrollo de estos objetivos se llevó a cabo considerando las recomendaciones internacionales generales para la evaluación del empleo de probióticos en los alimentos, como las que se reflejan en el documento *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, preparado por una Comisión Conjunta de Expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) (FAO/WHO, 2002). Asimismo, en este trabajo de investigación se tuvieron en consideración diversos documentos publicados por, entre otros, el Comité Científico para la Nutrición Animal (SCAN) de la EFSA acerca del estatus QPS, la evaluación de la seguridad de los microorganismos empleados en los alimentos y piensos, su identificación y filiación taxonómica y su resistencia a los antibióticos de importancia clínica (EFSA, 2005a, 2005b, 2007, 2011, 2012a, 2012b). Además, se consideraron también las recomendaciones recogidas en la reciente literatura científica sobre este tema de acuciante interés y actualidad e indudable importancia para la Salud Pública y la protección medioambiental (Verschuere *et al.*, 2000b; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Gatesoupe, 2008; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010a; Merrifield *et al.*, 2010b; Dimitroglou *et al.*, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). Por todo ello, para lograr estos objetivos en este trabajo de investigación se procedió al desarrollo y consecución de los objetivos parciales que se enumeran a continuación:

1. Determinación del espectro de acción antimicrobiana de bacterias lácticas, aisladas previamente de pescado, marisco y productos de la pesca por nuestro grupo de investigación, frente a

microorganismos patógenos Gram-positivos y Gram-negativos productores de ictiopatologías de relevancia para la acuicultura.

2. Evaluación de la seguridad *in vitro* de bacterias lácticas de origen acuático.

2.1. Evaluación genotípica de la presencia de los determinantes genéticos que codifican la síntesis de diversos factores de virulencia descritos en el género *Enterococcus*.

2.2. Evaluación fenotípica de la actividad hemolítica y gelatinasa.

2.3. Evaluación genotípica y fenotípica de la susceptibilidad a diversos antibióticos empleados en medicina humana y veterinaria

2.4. Evaluación fenotípica de la actividad mucinolítica.

2.5. Evaluación fenotípica de la desconjugación de sales biliares.

2.6. Evaluación fenotípica de diversas actividades enzimáticas.

2.7. Evaluación fenotípica y genotípica de la producción de aminas biógenas.

3. Tipificación molecular de cepas de *Enterococcus faecium* de origen acuático.

4. Evaluación *in vivo* del efecto de bacterias lácticas de origen acuático en la protección de *Artemia franciscana* frente a *Vibrio campbellii*.

4.1. Determinación del espectro de acción antimicrobiana frente a *V. campbellii*.

4.2. Determinación del modo de acción frente a *V. campbellii*.

4.3. Evaluación de su eficacia para la protección de *A. franciscana* frente a *V. campbellii* empleando ensayos de exposición de cultivos gnotobióticos.

5. Evaluación *in vitro* del efecto de bacterias lácticas de origen acuático en la viabilidad y estimulación de leucocitos de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.).

5.1. Evaluación *in vitro* del efecto en la proliferación y muerte celular (apoptosis) de leucocitos de rodaballo.

5.2. Evaluación *in vitro* del efecto en la estimulación del estallido respiratorio y la activación de la fagocitosis en leucocitos de rodaballo.

6. Determinación del espectro de acción antimicrobiana de bacterias lácticas de origen acuático frente a los principales ictiopatógenos que afectan al cultivo del rodaballo (*Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio splendidus*).

7. Evaluación *in vitro* de las propiedades funcionales y probióticas de bacterias lácticas de origen acuático.

7.1. Evaluación de la capacidad para sobrevivir en el medio acuático marino.

- 7.2. Evaluación de la capacidad para sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal (tolerancia a pH ácidos y bilis de rodaballo).
- 7.3. Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie celular.
- 7.4. Evaluación de la capacidad de adhesión al mucus de piel y de intestino de rodaballo.
- 7.5. Evaluación de la capacidad para inhibir la adhesión de *T. maritimum* y *V. splendidus* al mucus de piel y de intestino de rodaballo.
- 8. Evaluación *in vivo* de la seguridad de bacterias lácticas de origen acuático para larvas y juveniles de rodaballo.
- 9. Evaluación *in vivo* del efecto de bacterias lácticas de origen acuático en la modulación de la expresión de genes de inmunidad en juveniles de rodaballo.

CHAPTER I

*General account of the research subject:
objectives*

Nowadays, extractive fishing seems to have reached its limit due to the over-exploitation of the fishing sources and the lack of new fishing grounds. Therefore, aquaculture is considered as the unique alternative to cover the world growing demand of fish in the future (FAO, 2010). One of the main challenges to be faced by the modern aquaculture industry to offer an enough and constant supply of safe and quality products is the prevention and control of fish diseases, mainly those of bacterial origin during the larval and early fry stages, which cause important losses in the production (Toranzo *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2009). Traditionally, antibiotics have been used (very often indiscriminately) as therapeutic and, in many cases, prophylactic agents against bacterial diseases; however, there is an overgrowing reticence for their use, not only by the health agencies but also by the fish farming sector and consumers, due to their harmful effects for the human and animal health, food safety and the environment (FAO, 2005; Cabello, 2006; EFSA, 2008b). Consequently, the majority of developed countries have enforced very stringent regulations about the use of antibiotics in aquaculture, such as the ban of antibiotics as prophylactic treatments, the restriction of authorized antibiotics, the control of veterinary prescription, the establishment and surveillance of Maximum Residue Limits (MRLs), and the ban of specific antibiotics due to their high toxicity or importance in human medicine and capability to induce antibiotic resistances (FAO, 2005; Cabello, 2006; EFSA, 2008a, 2008b). In this respect, although vaccination constitutes, in principle, the ideal control method, its application is hampered by several factors, such as availability, level of protection, economic cost, inefficacy in larval stages, growth delay, limitation in its efficacy when fish are infected by other pathogens or when immunostimulants are not used, alterations in product quality (*e.g.*, adhesion, chronic inflammation and melanosis), and, finally, animal stress, especially when vaccines are administered by intraperitoneal injection with the consequent repercussion in their immune response, and, therefore, in their productivity (EFSA, 2008a; Subasinghe, 2009; Toranzo *et al.*, 2009). Consequently, there is an increasing interest in the research and development of alternative or complementary strategies to chemotherapy and vaccination, which are effective, safe, easy to apply, economically efficient and environmentally friendly. In this context, there is a growing interest in the use of probiotics (Verschuere *et al.*, 2000b; Irianto and Austin, 2002; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010a; Merrifield *et al.*, 2010b; Defoirdt *et al.*, 2011; Dimitroglou *et al.*, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014), which are defined as live microbial adjuncts which have a beneficial effect on the host by: (i) modifying the host-associated or ambient microbial community, (ii) improving feed use or enhancing its nutritional value, (iii) enhancing the host response towards disease, and/or (iv) improving the physico-chemical and microbiological quality of its environment (Verschuere *et al.*, 2000b). Based on this definition, probiotics may include microbial adjuncts that (i) prevent the adhesion and proliferation of pathogenic microorganisms in the intestinal tract and superficial mucosa of aquatic animals, on the surfaces of fish farms, and in the aquatic environment of the cultured species; (ii) compete for the available nutrients; (iii) produce antimicrobial compounds; (iv) secure an optimal use of the feed by aiding in its digestion (growth stimulation); (v) improve water quality,

and/or (vi) stimulate the host immune system (Verschuere *et al.*, 2000b; Balcázar *et al.*, 2006; Vine *et al.*, 2006; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al.*, 2010b). In this context, the main mechanisms of action by which probiotics exert their beneficial effects are the following: (i) inhibition of the pathogenic microorganisms by competitive exclusion by means of production of bactericidal or bacteriostatic antimicrobial compounds (*e.g.*, bacteriocins, organic acid, hydrogen peroxide, lysozyme, ammonium and diacetyl) and siderophores (*e.g.*, of iron), competition by the adhesion sites of intestine and other superficial mucosa; (ii) improvement of the host nutrition due to the nutrient supply (*e.g.*, fatty acid, vitamins, polyamines, and essential amino acids) and/or enhancement of its digestion (*e.g.*, production of lipases, amylases, and proteases); (iii) stimulation of local and systemic immune response (*e.g.*, activation of humoral response, increase of phagocytic and respiratory burst activities, modulation of the cellular proliferation and differentiation, production of lysozyme, peroxidase and proteases, complement activation, and production of cytokines) by different cell wall components (*e.g.*, lipopolysaccharides, peptidoglycans, and β -glucans), and finally (iv) improvement of water quality (*e.g.*, conversion of organic matter in CO₂ and reduction of ammonium and nitrite levels) (Verschuere *et al.*, 2000b; Balcázar *et al.*, 2006, 2007b; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010a; Merrifield *et al.*, 2010b; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). Most probiotics proposed as biocontrollers and bioremediation agents for aquaculture belong to the lactic acid bacteria group (mainly to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, and *Carnobacterium*), to the genera *Bacillus*, *Vibrio*, and *Pseudomonas*, and to the species *Saccharomyces cerevisiae* (Verschuere *et al.*, 2000b; Chabrillón *et al.*, 2007; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010a; Dimitroglou *et al.*, 2011). Despite lactic acid bacteria do not constitute the predominant intestinal microbiota of fish, these bacteria are part of this microbiota (Ringø *et al.*, 2000, 2010a; Ringø and Holzapfel, 2000; Irianto and Austin, 2002; Gatesoupe, 2008; Desriac *et al.*, 2010), supporting their use as probiotics in aquaculture (Verschuere *et al.*, 2000b; Chabrillón *et al.*, 2007; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al.*, 2010b). The main antagonistic mechanisms of lactic acid bacteria are the competence for nutrients, formation of organic acids (lactic and acetic acid), and the production of ribosomally-synthesized antimicrobial peptides or proteins referred to as bacteriocins (Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). Considering that most lactic acid bacteria are currently considered as safe microorganisms for human and animal consumption (GRAS [Generally Recognized As Safe] status, established by the Food and Drug Administration [FDA] in USA, or its European equivalent, QPS [Qualified Presumption of Safety] status, established by the European Food Safety Agency [EFSA]) (EFSA, 2005a, 2005b, 2007), and that some strains producing bacteriocins (bacteriocinogenic) inhibit pathogenic microorganisms responsible for human and animal infections and reduction of animal production, their use as probiotics in humans and animals in order to reduce the use of antibiotics has been suggested (Ryan *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1999; Kirkup, 2006; Gatesoupe, 2008; Gillor *et al.*, 2008; Millette *et al.*, 2008; Sang and Blecha, 2008).

Considering all the above mentioned, the main goals of the present research work are the following: (i) *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity against pathogenic bacteria of lactic acid bacteria previously isolated by our research group from fish, seafood and fish products; (ii) evaluation of their *in vitro* safety and molecular typification; (iii) *in vitro* evaluation of their immunostimulatory ability and functional properties; (iv) *in vivo* evaluation of their effect on the protection of *Artemia franciscana* against *Vibrio campbellii*; (v) *in vivo* evaluation of their safety for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and their ability to modulate the expression of immune genes in this marine aquatic species of commercial interest for Spain. It is worthy to note that, although there are no specific national or international guidelines about the evaluation of probiotics intended for use in aquaculture, the planning and development of the objectives of this research work were carried out considering the international general recommendations for the evaluation of the use of probiotics in food, such as the Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, made by a Joint FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)/WHO (World Health Organization) Working Group (FAO/WHO, 2002). Likewise, several documents published by the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) of EFSA about QPS status, safety assessment of microorganisms used in food and feed, their identification and taxonomic identification, and their resistance to antibiotic of clinical importance have been taken into consideration in this research work (EFSA, 2005a, 2005b, 2007, 2011, 2012a, 2012b). Additionally, the recommendations of recent scientific literature about this issue of great interest and undeniable importance for the Public Health and environmental protection were also considered (Verschuere *et al.*, 2000b; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Gatesoupe, 2008; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010a; Merrifield *et al.*, 2010b; Dimitroglou *et al.*, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). In order to achieve these general goals, the following partial objectives were addressed in this research work:

1. Determination of the antimicrobial activity spectrum of lactic acid bacteria, previously isolated from fish, seafood, and fish products by our research group, against Gram-positive and Gram-negative pathogenic microorganisms responsible for fish disease of relevance for aquaculture.
2. *In vitro* safety assessment of lactic acid bacteria of aquatic origin.
 - 2.1. Genotypic evaluation of the genetic determinants encoding the synthesis of several virulence factors identified in the genus *Enterococcus*.
 - 2.2. Phenotypic evaluation of hemolytic and gelatinase activities.
 - 2.3. Genotypic and phenotypic evaluation of the susceptibility to antibiotics used in human and animal medicine.
 - 2.4. Phenotypic evaluation of mucinolytic activity.
 - 2.5. Phenotypic evaluation of bile salt deconjugation.

- 2.6. Phenotypic evaluation of several enzymatic activities.
- 2.7. Genotypic and phenotypic evaluation of biogenic amine production.
3. Molecular typification of *Enterococcus faecium* strains of aquatic origin.
4. *In vivo* evaluation of the effect of lactic acid bacteria of aquatic origin on the protection of *Artemia franciscana* against *Vibrio campbellii*.
 - 4.1. Determination of the antimicrobial activity spectrum against *V. campbellii*.
 - 4.2. Determination of the mode of action against *V. campbellii*.
 - 4.3. Evaluation of their efficacy for the protection of *A. franciscana* against *V. campbellii* using gnotobiotic challenge tests.
5. *In vitro* evaluation of the effect of lactic acid bacteria of aquatic origin on the viability and stimulation of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) leucocytes.
 - 5.1. *In vitro* evaluation of the effect on the proliferation and cell death (apoptosis) of turbot leucocytes.
 - 5.2. *In vitro* evaluation of the effect on the respiratory burst activity and phagocytosis activation in turbot leucocytes.
6. Determination of the antimicrobial activity spectrum of lactic acid bacteria of aquatic origin against the main fish pathogens affecting turbot farming (*Tenacibaculum maritimum* and *Vibrio splendidus*).
7. *In vitro* evaluation of the functional and probiotics properties of lactic acid bacteria of aquatic origin.
 - 7.1. Evaluation of their ability to survive in seawater.
 - 7.2. Evaluation of their ability to survive to the conditions of the gastrointestinal tract (tolerance to low pH and turbot bile).
 - 7.3. Evaluation of the cell surface hydrophobicity.
 - 7.4. Evaluation of the adhesion ability to turbot skin and intestinal mucus.
 - 7.5. Evaluation of the ability to inhibit the adhesion of *T. maritimum* and *V. splendidus* to turbot skin and intestinal mucus.
8. *In vivo* evaluation of the safety of lactic acid bacteria of aquatic origin in turbot larvae and juveniles.
9. *In vivo* evaluation of the effect of lactic acid bacteria of aquatic origin on the modulation of the expression of immunity genes in turbot juveniles.

CAPÍTULO II

Introducción

II.1. LA ACUICULTURA

II.1.1. DEFINICIÓN DE ACUICULTURA Y SISTEMAS DE CULTIVO

La Acuicultura, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, del inglés *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), se define como “el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, lo cual implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar la producción, en operaciones como la siembra, la alimentación y la protección de depredadores, siendo propiedad de una persona física o jurídica” (FAO/NACA/WHO, 1999). Por su parte, la Unión Europea entiende la Acuicultura como “la cría o cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a aumentar su producción por encima de las capacidades naturales del medio” (Reglamento CE nº 2792/1999 del Consejo de 17 de diciembre). Los principales sistemas de cultivo empleados en acuicultura son los siguientes (CE, 2012a):

- 1. Acuicultura extensiva en agua dulce.** En este sistema, los estanques se mantienen de manera que se favorezca el desarrollo de la fauna acuática con un rendimiento superior al del ecosistema natural. La densidad de peces es baja y la alimentación es natural. Algunos productores aportan un complemento alimenticio. Estos estanques desempeñan un papel importante y positivo en el paisaje, la gestión del agua y la biodiversidad. El cultivo de la carpa común (*Cyprinus carpio*), en policultivo con otras especies como el corégono (*Coregonus* spp.), lucioperca (*Sander lucioperca*), lucio (*Esox lucius*) y bagre (orden Siluriformes), representa un ejemplo de acuicultura extensiva en agua dulce.
- 2. Acuicultura intensiva en agua dulce.** En este sistema, los peces se crían en cuencas construidas en obra sobre los márgenes de los ríos aprovechando la circulación natural del agua hasta que alcanzan la talla comercial. Existen dos técnicas: (i) de flujo continuo, en el que el agua río arriba alimenta las cuencas y vuelve a la corriente río abajo, y (ii) de recirculación, en el que el agua permanece en circuito cerrado y es reciclada para volver a circular por el estanque. Los sistemas de recirculación son más caros por la energía que necesitan, pero permiten un mejor control de las condiciones de cría (temperatura y oxígeno) y de la calidad del agua. Las especies de agua dulce que se crían en este sistema intensivo son: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), anguila (*Anguilla anguilla*), bagre, esturión (*Huso huso* y *Acipenser* spp.) y tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).
- 3. Acuicultura extensiva en agua salobre.** En este sistema, los peces se mantienen en lagunas de agua salobre acondicionadas. La introducción de alevines en incubadoras y la aportación complementaria de alimento refuerzan el carácter semi-extensivo de este sistema de criadero. Este tipo de acuicultura desempeña un papel importante en la conservación del patrimonio natural costero. Las especies que se cultivan en este sistema extensivo son: lubina (*Dicentrarchus labrax*),

anguila, lenguado común (*Solea solea*), lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), dorada (*Sparus aurata*), lisa (*Liza* spp.), esturión y camarones (infraorden Caridea).

4. **Acuicultura de especies marinas en instalaciones en tierra.** La cría de peces marinos, sobre todo peces planos, puede desarrollarse también en cuencas artificiales instaladas en tierra y que obtienen el agua mediante bombeo desde captaciones en el mar. La circulación del agua proporciona un entorno cerrado y controlado que es necesario para una producción óptima en los criaderos y las incubadoras de las especies marinas. Las principales especies que se crían en este sistema son: rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.), lenguado común, lenguado senegalés, lubina y dorada.
5. **Acuicultura marina en jaula.** Los peces permanecen en jaulas ancladas en el fondo del mar y mantenidas a flote por un marco de plástico flotador. Este tipo de cría se practica sobre todo en las zonas resguardadas cercanas a la costa. Las principales especies que se crían en este sistema son: salmón del Atlántico (*Salmo salar*), lubina, dorada y perca regia (*Argyrosomus regius*).
6. **Cría de moluscos.** La cría de moluscos se basa en la recolección de larvas salvajes o de la incubadora que se alimentan a base de nutrientes naturales presentes en el medio ambiente. Para ello se emplean estructuras flotantes para la realización de acuicultura en el mar. Existen una gran diversidad de técnicas: en el fondo, en tablas, en postes de madera, en cuerdas, etc. Los principales moluscos que se crían en este sistema son: ostra (*Ostrea* spp.), mejillón (familia *Mytilidae*), almeja (órdenes Myoida y Veneroida) y oreja de mar (*Haliotis* spp.).

II.1.2. HISTORIA DE LA ACUICULTURA

El origen de la acuicultura se remonta a hace más de 4500 años. Los primeros restos arqueológicos que denotan la existencia de actividades acuícolas son los existentes en un bajo relieve sobre el muro de un templo egipcio que data del año 2500 a. C., en el que se representa el cultivo de peces en un estanque artificial (Corral *et al.*, 1999). Se tiene constancia de que los egipcios criaban tilapia del Nilo en estanques a lo largo del río (Betro, 1996), como ilustran las pinturas de algunas tumbas del Antiguo Egipto (Fig. 2.1). Las primeras actividades acuícolas que se han descrito son las relacionadas con el cultivo de la carpa común durante el período comprendido entre los años 2000–1000 a. C. en China (Rabanal, 1988). Años más tarde, aproximadamente en el 475 a. C., Fan Lai, un político chino convertido en acuicultor, escribió el primer tratado sobre el cultivo de peces (*The Classic of Fish Culture*) (Fig. 2.2). Este libro es el primer registro escrito en el que se detalla por primera vez la estructura de un estanque y se describe el método



Figura 2.1. Estanque en el jardín. Fragmento de la tumba de Nebamun (ca., 1350 a. C., cerca de Tebas, Luxor, Egipto). Anónimo. Fuente: Museo Británico.

de reproducción de la carpa común y del crecimiento de los alevines (Rabanal, 1988; Corral *et al.*, 1999; González Serrano, 2001). Los siguientes siglos (500 a. C.–500 d. C.) se consideran la Edad de Oro del desarrollo del cultivo de la carpa común en China y en los países vecinos debido al progreso y a la difusión de las técnicas desarrolladas en los sistemas de cultivo (Rabanal, 1988). En el año 460 a. C. se documentó por primera vez el cultivo de la ostra en China. Los orígenes de la acuicultura en Europa hacen referencia a los escritos de Aristóteles (384–382 a. C.), en los que se mencionaban los cultivos de la ostra en Grecia y las diferentes calidades de este molusco (González Serrano, 2001). Más adelante, Plinio el Viejo (23–79 d. C.) dejó constancia en sus escritos de que en 160 a. C., el acuicultor



Figura 2.2. Reproducción del libro de Fan Lei (475 a. C.). Fuente: Rabanal (1988)

Sergius Orata desarrolló los primeros parques ostrícolas en la bahía de Nápoles (González Serrano, 2001). En Roma, Apicio (*ca.*, siglo I d. C.), escribió un recetario en latín sobre materia de cocina (*De Re coquinaria*), en el que se hace referencia a métodos de engorde y conservación de las ostras para su transporte. Por su parte, Columela (4–70 d.C.), escritor agronómico romano, afirmó en su obra *De Re Rustica* (Los trabajos del campo) que especies marinas como la lubina y la dorada eran capaces de adaptarse a la cría vigilada en estanques. Más tarde (*ca.*, 321–300 d. C.), se describió por primera vez en

la India el empleo de reservorios para mantener a los peces (Rabanal, 1988). Posteriormente, durante el

reinado de la dinastía Tang (618–906 d. C.) en China, se dejó de cultivar la carpa común por motivos religiosos y políticos, dando lugar al descubrimiento de otras especies acuícolas para su cultivo, como la carpa silvestre (*Hypophthalmichthys molitrix*), la carpa cabezona (*Hypophthalmichthys nobilis*), la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) y la carpa siamesa de barro (*Henicorhynchus siamensis*), así como al desarrollo de sistemas de policultivo de varias especies para maximizar la producción (Rabanal, 1988; González Serrano, 2001). En 1243 d. C., Chow Mit describió el transporte de alevines en raquetas de bambú y posteriormente, durante la dinastía china Ming (1368–1648 d. C.), se desarrollaron por completo los métodos para el cultivo de peces desde alevines a adultos y se describieron de forma más detallada las estructuras de los tanques, la densidad para la cría de los peces, los sistemas de policultivo y rotación, la aplicación de alimento y fertilizantes y el control de enfermedades (Rabanal, 1988). En el siglo XIV, el monje francés Pinchot puso a punto la reproducción de la trucha, consiguiendo así la posterior difusión de esta especie por toda Europa y el resto del mundo (González Serrano, 2001). Un siglo después (*ca.*, 1400 d. C.), se registró por primera vez el cultivo de peces en zonas de agua salobre en Indonesia. Esta actividad llegó a otros países vecinos, incluyendo

Filipinas, Malasia, Tailandia y Taiwán y alcanzó un gran desarrollo durante el siglo XV en los países bañados por el Mediterráneo (Rabanal, 1988; González Serrano, 2001). En 1639 d.C., se publicó en China el Libro Completo de Agricultura en el que se incluyó el cultivo de peces en estanques. Y en los años siguientes, durante la dinastía de Ching (1644–1911 d. C.), se describieron con más detalle los métodos de producción, diferenciación, separación y transporte de alevines (Rabanal, 1988). En 1852 se construyó la piscifactoría de Heninque (Francia) y en 1855 se importó la trucha arcoíris desde EE.UU. hasta Francia. También en este mismo año, se iniciaron los primeros cultivos del mejillón en Venecia y en 1879 se iniciaron los primeros cultivos de almeja en Francia. Durante el siglo XIX, otros países comenzaron las actividades acuícolas con diversas especies, como Eslovenia y Croacia con ciprínidos y salmónidos, Japón con anguila y ciprínidos, EE.UU con el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), Escocia con peces planos y Noruega con bacalao del Atlántico, rodaballo, lenguado y bogavante (*Homarus gammarus*) (Corral *et al.*, 1999; González Serrano, 2001).

En la Península Ibérica, el primer documento en el que se hace referencia a la acuicultura es el Fuero Juzgo del rey Recesvinto, cuyo reinado tuvo lugar desde el año 653 hasta 672 d. C., en el que se citan medidas de fomento de riqueza piscícola. En 1129 d. C., el arzobispo de Santiago de Compostela, Diego Xelmírez dejó la orden de desarrollar en el río Sar en A Coruña (Galicia), el primer criadero de truchas de la Península (González Serrano, 2001; Fernández Casal, 2013). En 1258, Alfonso X el Sabio, reglamentó la protección de peces inmaduros y durante la Edad Media la mayoría de las actividades acuícolas se llevaron a cabo en estanques en diferentes regiones (El Escorial, Madrid; Yuste, Cáceres; San Martín de Castañeda, Cantabria) por las órdenes monásticas. Sin embargo, las raíces de estas actividades con peces marinos tuvieron lugar en los esteros de Cádiz, Albuferas de Valencia y Baleares y salinas de Murcia (González Serrano, 2001). En 1863 se comenzó con el cultivo de la ostra en Hondarribia (País Vasco) y en 1867 se construyó la piscifactoría de La Granja de San Ildefonso (Segovia) por orden de Isabel II para la repoblación de peces y se comenzaron las primeras actividades piscícolas en El Monasterio de Piedra (Zaragoza). En 1882, se promulgó el primer Real Decreto sobre el desarrollo de la industria piscícola en España. En 1888, se realizaron experiencias en acuicultura marina en la ría de Boo (Cantabria) y en 1943 se creó la primera empresa industrial (Piscicultura Industrial) en Huelva. En 1946, se crearon con éxito las bateas para el cultivo del mejillón en la ría de Arosa (Galicia), convirtiendo a España en el principal productor de mejillón (González Serrano, 2001).

A partir del siglo XX, la acuicultura se expandió por todo el mundo, seleccionándose e intensificándose la producción de un mayor número de especies y alcanzando una producción industrial a gran escala que continúa hasta la actualidad.

II.1.3. ESTADO MUNDIAL DE LA ACUICULTURA

El documento “El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura” (FAO, 2014), también conocido como SOFIA (del inglés, *The State of World Fisheries and Aquaculture*), elaborado por el Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, presenta el panorama mundial de la pesca y la acuicultura, e incluye las tendencias y estadísticas del sector. Este documento se publica bienalmente para proporcionar a los responsables políticos, la sociedad civil y las personas cuyos medios de vida dependen del sector una visión amplia, objetiva y global de la pesca y la acuicultura. A continuación se ofrece un breve resumen de lo que se expone en la última versión disponible de este documento.

II.1.3.1. Producción mundial de acuicultura

La producción mundial de pescado sigue creciendo a un ritmo más rápido que la población mundial y la acuicultura se mantiene como uno de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento. En el transcurso de medio siglo aproximadamente, la acuicultura ha pasado de ser casi insignificante con 0,6 millones de toneladas (*t*) en 1950 a alcanzar su máximo histórico de producción en 2012 con 90,4 millones de *t*, incluyendo 66,6 millones de *t* de peces comestibles (Fig. 2.3) y 23,8 millones de *t* de plantas acuáticas, principalmente algas marinas. En este sentido, el término de peces comestibles comprende peces de escama, crustáceos, moluscos, anfibios, tortugas de agua dulce y otros animales acuáticos destinados al consumo humano. En los últimos cinco años se ha observado cómo la pesca de captura se ha estabilizado (91,3 millones de *t*), mientras que la producción de pescado de acuicultura ha alcanzado los 66,6 millones de *t*, lo que representa un aumento de más de 16 millones de *t* respecto al año 2007 (Tabla II.1). Según la información más reciente de la FAO, las producciones acuícolas mundiales de peces comestibles y plantas acuáticas cultivadas han aumentado hasta 70,5 y 26,1 millones de *t*, respectivamente, en el año 2013.

La tendencia mundial según la cual el desarrollo de la acuicultura adquiere importancia en el suministro total de pescado se ha mantenido de forma ininterrumpida. Los peces comestibles cultivados contribuyeron con un porcentaje sin precedentes del 42,2% del total de 158 millones de *t* de pescado producido por la pesca de captura (incluido el destinado a usos no alimentarios) y la acuicultura en 2012 (Fig. 2.3), frente al porcentaje del 13,4% en 1990 y el 25,7% en el año 2000.

En lo que se refiere al consumo mundial de pescado *per capita*, este aumentó de un promedio de 9,9 kg en 1960 a 19,2 kg en 2012 (Tabla II.1), lo que se ha debido a una combinación de crecimiento demográfico y aumento de los ingresos y urbanización y ha sido propiciado por la fuerte expansión de la producción pesquera y la mayor eficacia de los canales de distribución.

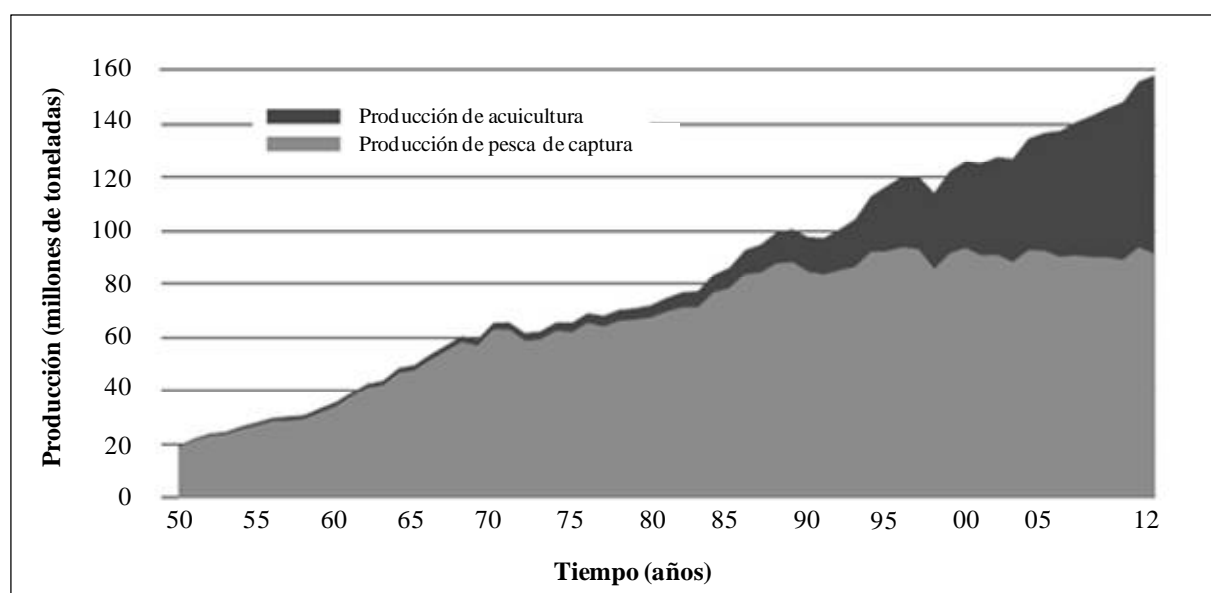


Figura 2.3. Evolución de la producción acuática mundial (acuicultura y pesca de captura) en el periodo 1950–2012. Fuente: FAO (2014).

Tabla II.1. Producción y utilización de la pesca de captura y la acuicultura^a en el mundo.

	2007	2008	2009	2010	2011	2012 ^b
Millones de toneladas						
Producción						
Pesca de captura						
Continental	10,1	10,3	10,5	11,3	11,1	11,6
Marítima	80,7	79,9	79,6	77,8	82,6	79,7
Pesca de captura total	90,8	90,1	90,1	89,1	93,7	91,3
Acuicultura						
Continental	29,9	32,4	34,3	36,8	38,7	41,9
Marítima	20,0	20,5	21,4	22,3	23,3	24,7
Acuicultura total	49,9	52,9	55,7	59,0	62,0	66,6
Producción pesquera mundial total	140,7	143,1	145,8	148,1	155,7	158,0
Utilización						
Consumo	117,3	120,9	123,7	128,2	131,2	136,2
Usos no alimentarios	23,4	22,2	22,1	19,9	24,5	21,7
Población (miles de millones)	6,7	6,8	6,8	6,9	7,0	7,1
Suministro <i>per capita</i> de pescado comestible (kg)	17,6	17,9	18,1	18,5	18,7	19,2

^aNo se contabilizan las plantas acuáticas. ^bLas cifras para 2012 son estimaciones provisionales. Fuente: FAO (2014).

Se prevé que para el año 2030 la pesca de captura y de acuicultura contribuirán de la misma manera a la producción pesquera mundial total y es probable que después de ese año se produzca un predominio de la acuicultura, pudiendo suministrar hasta más del 60% del pescado para consumo humano directo.

II.1.3.2. Distribución de la producción acuícola mundial

La distribución de la producción acuícola mundial es desigual, ya que Asia representa el 88% de la producción total (Tabla II.2), siendo China el país con mayor producción de peces comestibles (41,1 millones de *t*). A nivel mundial, 15 países produjeron el 92,7% de todos los peces comestibles cultivados en 2012, entre ellos, Chile, Egipto y Brasil. Por otro lado, países como Tailandia han visto una disminución en su producción en los años 2011–2012 debido principalmente a las inundaciones de 2011 y a las patologías en la cría de camarón.

Tabla II.2. Producción acuícola por continente del total de la producción mundial^a.

Continente		Producción acuícola (año)					
		1990	1995	2000	2005	2010	2012 ^b
África	Toneladas	81.015	110.292	399.688	646.182	1.286.591	1.485.367
	%	0,62	0,45	1,23	1,46	2,18	2,23
América	Toneladas	548.479	919.571	1.423.433	2.176.740	2.581.089	3.187.319
	%	4,19	3,77	4,39	4,91	4,37	4,78
Asia	Toneladas	10.801.531	21.677.062	28.420.611	39.185.417	52.436.025	58.895.736
	%	82,61	88,90	87,67	88,46	88,82	88,39
Europa	Toneladas	1.601.649	1.581.359	2.052.567	2.137.340	2.548.094	2.880.641
	%	12,25	6,49	6,33	4,83	4,32	4,32
Oceanía	Toneladas	42.005	94.238	121.482	151.466	185.617	184.191
	%	0,32	0,39	0,37	0,34	0,31	0,28
Producción mundial Toneladas		13.074.679	24.382.522	32.417.781	44.297.145	59.037.416	66.633.253

^aNo se contabilizan las plantas acuáticas ni los productos no alimentarios. ^bLas cifras para 2012 son estimaciones provisionales.
Fuente: FAO (2014).

II.1.3.3. La acuicultura continental y marina

La producción mundial de peces comestibles obtenida de la acuicultura continental y la procedente del cultivo marino presentaban el mismo volumen de 2,35 millones de *t* en 1980. Sin embargo, el crecimiento de la acuicultura en aguas continentales ha sido desde entonces superior al crecimiento del cultivo marino. De los 66,6 millones de *t* de peces comestibles cultivados que se produjeron en 2012, dos tercios (44,2 millones de *t*) fueron especies de peces de escama obtenidas de la acuicultura continental (38,6 millones de *t*) y marina (5,6 millones de *t*) (Tabla II.3). Aunque las especies de peces de escama procedentes de la acuicultura marina representan sólo el 12,6% del volumen de la producción total de peces de escama cultivados, su valor supone el 26,9% del valor total de todas las especies de peces de escama cultivadas. Esto se debe a que los peces de escama procedentes de la

acuicultura marina comprenden una gran parte de especies carnívoras, como el salmón del Atlántico y los meros (*Epinephelus* spp.), cuyo valor unitario es superior al de la mayoría de peces de escama criados en agua dulce. En 2012, los crustáceos cultivados representaron el 9,7% (6,4 millones de *t*) de la producción acuícola de peces comestibles (Tabla II.3), pero el 22,4% en valor. Sin embargo, la producción de moluscos duplicó la de crustáceos (15,2 millones de *t*) (Tabla II.3), aunque su valor fue sólo la mitad.

Tabla II.3. Producción mundial de grupos de especies cultivadas procedentes de la acuicultura en aguas continentales y en cultivo marino en 2012.

	Acuicultura continental (millones de toneladas)	Acuicultura marina (millones de toneladas)	Cantidad subtotal	
			Millones de toneladas	Porcentaje (%)
Peces de escama	38,60	5,55	44,15	66,25
Crustáceos	2,53	3,92	6,45	9,70
Moluscos	0,29	14,88	15,17	22,75
Otras especies	0,53	0,34	0,87	1,30
Total	41,95	24,69	66,64	100,00

Fuente: FAO (2014).

II.1.3.4. Especies producidas

En 2012, el número de especies registradas en las estadísticas de la FAO ascendió a 567, incluidos peces de escama (354 especies), moluscos (102), crustáceos (59), anfibios y reptiles (6), invertebrados acuáticos (9) y algas marinas y de agua dulce (37). Al no haberse producido cambios importantes en los dos últimos años con respecto a la especies producidas, la edición 2012 de “El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura” aporta más información sobre las principales especies y grupos de especies producidos en la acuicultura y las relaciones proporcionales entre ellos (FAO, 2012) . La composición de la producción acuícola mundial en el año 2010 fue la siguiente: peces de agua dulce (33,7 millones de *t*; 56,4%), moluscos (14,2 millones de *t*; 23,6 %), crustáceos (5,7 millones de *t*; 9,6%), peces diádomos (3,6 millones de *t*; 6,0 %), peces marinos (1,8 millones de *t*; 3,1%) y otros animales acuáticos (814.300 *t*; 1,4 %).

En la producción de peces de agua dulce predominan las carpas (24,2 millones de *t*; 71,9 %), seguida de la de tilapia, que tiene una amplia distribución, ya que el 72 % se cría en Asia (principalmente en China y el sudeste asiático), el 19% en África y el 9% en América. La producción de bagres omnívoros (*Pangasius* spp.) predomina en Vietnam aunque hay otros países productores, como Indonesia y Bangladesh. Las especies carnívoras, como las percas y las carpa de lodo o cabezas de serpiente (*Channa striata*) representan solo el 2,6 % de la producción de los peces de agua dulce. En la producción de especies de peces migratorias, predomina la producción del salmón del Atlántico,

seguido del sabalote (*Chanos chanos*) y trucha arcoíris. La producción de anguilas en Japón y Europa, criadas en su mayoría en el este de Asia y en menor medida en Europa, se ha mantenido en unas 270.000 t en los últimos años. La cría de esturiones, para la obtención de carne y caviar, ha aumentado constantemente en Asia, Europa y América, aunque la producción es todavía pequeña. La producción mundial de peces marinos está distribuida de forma más homogénea entre las especies cultivadas (jureles, pámpanos y caballas, esciénidos y corvinas, dorada, lisas, lubina, serránido japonés, mero y rodaballo). Sin embargo, casi medio millón de toneladas, es decir, una cuarta parte de la producción mundial, son notificadas sin identificar las especies, sobre todo por parte de algunos de los principales productores de Asia.

La producción acuícola mundial de crustáceos en 2010 consistió en especies de agua dulce (29,4%) y especies marinas (70,6 %). En la producción de especies marinas predomina el camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), contrastando de forma acusada con la producción de langostino jumbo (*Penaeus monodon*) que ha perdido importancia en el último decenio. Las principales especies de agua dulce incluyen cangrejo de las marismas (*Procambarus clarkii*), cangrejo chino (*Eriocheir sinensis*) y camarón gigante (*Macrobrachium rosenbergii*).

En cuanto a los moluscos, la producción acuícola de almejas y berberechos (familia Cardiidae) se ha incrementado mucho más rápido que la de otros grupos de especies. En 1990, la producción de almejas y berberechos era la mitad de la producción de ostras, pero en 2008 superó a estas últimas pasando a ser el grupo de especies de moluscos de mayor producción. Entre los animales acuáticos, la producción de cohombres de mar y tortugas de caparazón blando se ha incrementado rápidamente.

II.1.3.5. Grupos de especies cultivadas según los principales países productores

Entre los productores más importantes, los principales grupos de especies cultivadas y los sistemas de cría más importantes varían considerablemente. A este respecto, India, Bangladesh, Egipto, Myanmar y Brasil dependen considerablemente de la acuicultura continental de peces de escama. Sin embargo, la acuicultura noruega depende casi exclusivamente del cultivo marino de peces de escama, especialmente de la cría en jaulas de salmón del Atlántico. La acuicultura chilena es similar a la noruega, aunque también cuenta con una importante producción de moluscos, sobre todo mejillón, y peces de escama cultivados en agua dulce. En Japón y República de Corea, mucho más de la mitad de sus respectivas producciones de especies comestibles corresponden a moluscos marinos y su producción de peces de escama cultivados depende más del cultivo marino en jaulas. La mitad de la producción de Tailandia son crustáceos, que en su mayoría corresponden a especies de camarón marino comercializadas a nivel internacional. Indonesia tiene una proporción relativamente amplia de producción de peces de escama procedentes de cultivo marino, que depende fundamentalmente de estanques de aguas costeras salobres; asimismo, cuenta con el cuarto subsector de cultivo de camarón

marino más grande del mundo. Filipinas produce más peces de escama procedentes del cultivo marino que de la acuicultura de agua dulce, obteniéndose principalmente en jaulas en aguas marinas y salobres. En Vietnam, más de la mitad de los peces de escama procedentes de la acuicultura continental son bagres (*Pangasius* spp.), que se comercializan en el exterior. Además, su subsector de cultivo de crustáceos, en particular, camarones marinos y el camarón gigante de agua dulce, solo es menor que el de China y Tailandia. China está muy diversificada en cuanto a los sistemas de cría y especies de acuicultura. En este país, la cría de peces de escama en agua dulce constituye el suministro básico de especies comestibles para su mercado interno, mientras que el subsector del cultivo marino de peces de escama, especialmente el cultivo marino en jaulas, es comparativamente débil.

II.1.4. LA ACUICULTURA EN LA UNIÓN EUROPEA

De acuerdo con los datos de la FAO y de la Federación Europea de Productores de Acuicultura (FEAP; del inglés *Federation of European Aquaculture Producers*), la acuicultura es una fuente importante de productos acuáticos de calidad en la Unión Europea (UE). En 2012, la UE produjo 1,27 millones de *t* de productos de la acuicultura, lo que representa el 21,2% del volumen de la producción acuática total de la UE, incluyendo los datos procedentes de acuicultura y pesca. La producción total de productos acuáticos llegó a alcanzar un máximo de 10,6 millones de *t* en 1988 y desde entonces ha caído hasta 6,3 millones de *t*, lo que supone una reducción del 40,6%. Esta reducción en la producción acuícola total se debe principalmente a la caída de la actividad pesquera y a la reducción de capturas procedentes de la pesca extractiva que no ha podido ser compensada por la acuicultura durante estas dos últimas décadas.

La importancia de la acuicultura no es igual en todos los países de la UE. A este respecto, según los datos de 2012, España es el Estado miembro de la UE con un mayor volumen de producción (264.162 *t*; 21,0% del total de la UE), seguido por Francia (205.210 *t*; 16,3%) y Reino Unido (203.036 *t*; 16,1%). Sin embargo, cuando se considera el valor de la producción, el Reino Unido es el principal Estado miembro productor (853 millones de €, 22,5% del valor total), seguido por Francia (704 millones de €, 18,6%), Grecia (623 millones de €, 16,4%) y España (395 millones de euros; 10,4%).

En la UE los principales productos de la acuicultura son pescados y moluscos, mientras que la producción de crustáceos, algas u otros invertebrados es muy reducida. En 2012, la producción de pescado sumó 662.281 *t* (52,2% del peso total) y los moluscos cosechados sumaron 601.736 *t* (47,4%). La UE produjo también algas (5.361 *t*) y crustáceos (285 *t*). La principal especie producida en la UE fue el mejillón (466.995 *t*), seguido de la trucha arcoíris (177.934 *t*) y el salmón Atlántico (175.349 *t*). Si se considera el valor de primera venta, el salmón Atlántico es la primera especie de crianza (822 millones de euros), seguida por la dorada (519 millones de euros) y la trucha arcoíris (483 millones de

euros). El consumo anual de productos acuáticos *per capita* en la UE es de 22,7 kg, valor muy superior a la media mundial de 19,2 kg. Este consumo varía entre los países de la UE, desde 5,3 kg en Hungría hasta los 57,2 kg en Portugal. España ocupa el tercer lugar con un consumo de 43 kg.

II.1.5. LA ACUICULTURA EN ESPAÑA

El documento “Acuicultura en España 2014” es un informe anual sobre la evolución del sector acuícola para conocer el estado de su actividad y apoyar su desarrollo sostenible, emitido por la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España (APROMAR) (2014). APROMAR es una organización de carácter profesional, voluntaria y sin ánimo de lucro, reconocida por Orden Ministerial de 30 de diciembre de 1986 como Organización de Productores (OP-30) a efectos nacionales y de la UE. El público al que va dirigido este documento no sólo es el conjunto de empresas del sector, sino también las administraciones públicas, políticos, medios de comunicación, profesionales libres, estudiantes y la sociedad en general.

De acuerdo con la información contenida en este documento, España dispone de variados recursos hídricos sobre los que se desarrolla la acuicultura, tanto marina como continental. Así pues, a los casi 8.000 km de costa se suman ocho grandes ríos (Duero, Ebro, Guadalquivir, Guadiana, Júcar, Miño, Segura y Tajo), numerosos cursos fluviales, lagos y una capacidad de agua embalsada superior a los 55.000 hm³, además de una orografía y diversidad de climas que proporcionan las características ambientales y físico-químicas requeridas para el desarrollo de la acuicultura. En 2012 se registraron en España un total de 5.132 establecimientos de acuicultura en funcionamiento, de los cuales 179 eran de acuicultura continental (agua dulce) y 4.953 de acuicultura en aguas marinas o salobres. Estos datos evidencian una constante reducción en los últimos años del número de establecimientos con actividad, pasando de los 5.306 establecimientos en 2003, a los 5.132 establecimientos actuales.

II.1.5.1. Principales especies producidas

La producción de acuicultura en España supuso un total de 264.161 t en 2012. La principal especie producida fue el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) y en relación con la acuicultura de peces, las tres primeras especies fueron la dorada, la trucha arcoíris y la lubina, seguidas de rodaballo, anguila y moluscos como ostras y almejas. También se cultivaron en España, aunque en menor cantidad, otras especies de interés como lenguado senegalés, besugo (*Pagellus bogaraveo*) y algas (Tabla II.4).

Tabla II.4. Producción y distribución de las principales especies cultivadas en España procedentes de la acuicultura continental y marina en 2013.

Especie	Producción (t)	Distribución (% de producción en las principales Comunidades Autónomas)
Acuicultura continental		
Peces		
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	16.732	Castilla y León (34,8%), Galicia (24,4%), Andalucía (9,5%), Cataluña (7,6%) y La Rioja (7,5%)
Acuicultura marina		
Peces		
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	16.795	Comunidad Valenciana (41,5%), Murcia (22,2%), Canarias (17,9%), Andalucía (10,6%) y Cataluña (7,7%)
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	14.707	Murcia (33,9%), Canarias (29,1%), Andalucía (25,7%) y Comunidad Valenciana (10,8%)
Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	6.814	Galicia (98,8%)
Lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>)	343	Galicia (87,5%), Canarias (8,7%) y Andalucía (3,8%)
Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)	315	Comunidad Valenciana (100%)
Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	228	Galicia (100%)
Perca regia (<i>Argyrosomus regius</i>)	89	Comunidad Valenciana (100%)
Moluscos		
Mejillón (<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	231.754	Galicia (98%)
Almeja japonesa (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	1.081	Galicia (93%)
Ostra plana (<i>Ostrea edulis</i>)	692	Galicia (99,7%)
Ostra japonesa (<i>Crassostrea gigas</i>)	529	Cataluña (56%), Galicia (31,3%) y Andalucía (12,7%)
Almeja babosa (<i>Venerupis pullastra</i>)	210	Galicia (100%)
Almeja fina (<i>Ruditapes decussatus</i>)	184	Galicia (93,6%)
Algas		
Macroalgas	3	Costa Norte de España (100%)

Fuente: APROMAR (2014).

II.1.5.1.1. El rodaballo

El rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) (Fig. 2.4) es una especie marina de interés comercial en España que presenta el cuerpo plano y ambos ojos en la parte superior situados sobre el lado izquierdo, con boca grande, mandíbula prominente y dentición igual a ambos lados. Las larvas son simétricas al principio, pero según se desarrollan, el ojo derecho se va desplazando hacia el lado izquierdo. La parte superior es oscura, de color marrón parduzco que varía según el entorno (imitando el color del sustrato), con numerosas manchas que también cubren las aletas, mientras que la parte inferior es despigmentada. No presenta escamas pero sí una serie de tubérculos óseos de superficie rugosa. Es una especie bentónica, que en vida silvestre vive en fondos marinos arenosos y lodosos a una profundidad desde 20 hasta 75 m. Es común en las costas europeas del Atlántico, aunque también habita en el Mar

Mediterráneo, Mar Negro y Mar Báltico. Desova entre mayo y julio en el Atlántico y entre febrero y abril en el Mediterráneo. Su alimentación en vida salvaje es carnívora, los juveniles se alimentan de moluscos y crustáceos y los adultos de peces y cefalópodos (APROMAR, 2014).



Figura 2.4. Ejemplar de rodaballo adulto. Fuente: Imagen del autor.

La cría en cautividad del rodaballo comenzó en los años setenta en el Reino Unido y se desarrolló posteriormente en Francia y España, y se lleva a cabo en condiciones estrictamente controladas en tanques de hormigón, a densidades bajas, en unas condiciones de temperatura y luz específicas y con alimentación a base de pienso comprimido húmedo. De esta forma se obtienen huevos pelágicos durante todo el año, conservándose en tanques de incubación hasta el momento de la eclosión (5–7 días). Las larvas se crían en sistemas semiintensivos (5 larvas/l) o intensivos (20–40 larvas/l), denominados criaderos o *hatcheries* y se alimentan con artemias y rotíferos. A partir del segundo mes de vida, inician su alimentación con piensos comerciales de diferente tamaño fabricados con ingredientes marinos. Cuando alcanzan un peso de 10 g, aproximadamente, se les traspasa a tanques mayores para un periodo previo al engorde, que dura varios meses, hasta que alcanzan los 100 g de peso. El crecimiento suele producirse en tanques exteriores terrestres, cuadrados o circulares, con un circuito abierto de bombeo de agua marina y cubiertos para evitar quemaduras en la piel de los peces por el sol. La densidad es de entre 20 y 40 kg/m² y suelen tardar entre 26 y 30 meses hasta alcanzar el tamaño de comercialización (1,5–2 kg) (Fig. 2.5) (CE, 2012b).

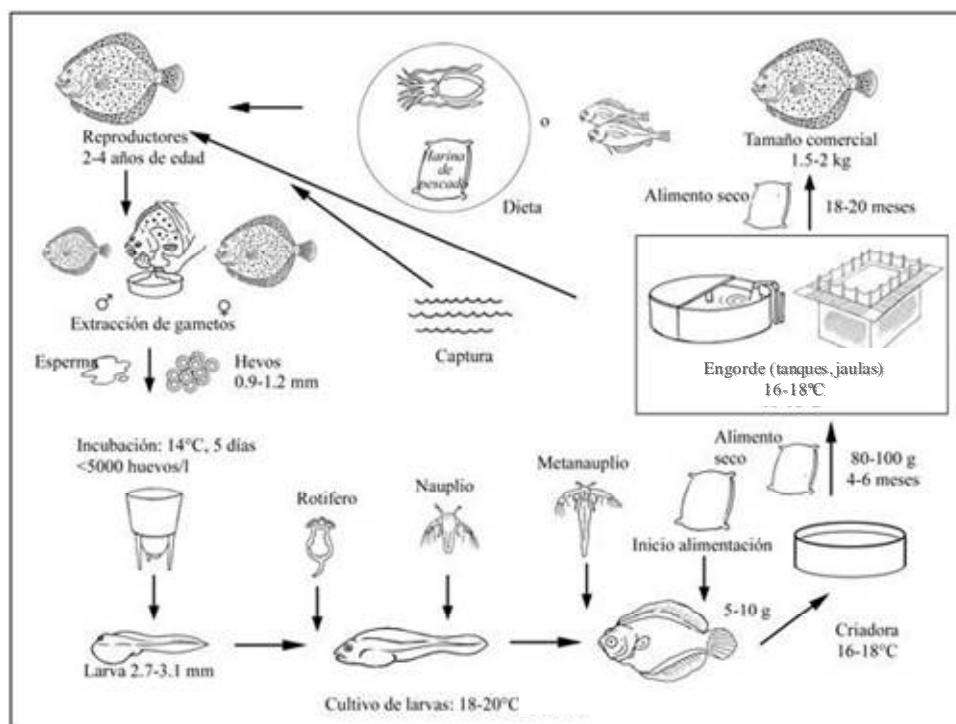


Figura 2.5. Ciclo de producción del rodaballo. Fuente: FAO (2005-2014).

El precio medio de primera venta del rodaballo de acuicultura en España en el año 2013 fue de 8,42 euros/kg, lo que significa un aumento del 14,1% con respecto al precio (7,38 euros/kg) del 2012. Su precio de venta al público (PVP) medio fue de 9,78 euros/kg. Este PVP supone un incremento del 16% sobre el precio de su primera venta (APROMAR, 2014).

El principal país productor de rodaballo en Europa es España, que puso en el mercado 6.814 t (88,3%) en 2013. Galicia es, con diferencia, la principal Comunidad Autónoma productora de rodaballo (98,8%), aunque también existen producciones reducidas de esta especie en Cantabria y País Vasco. La producción total de rodaballo de acuicultura en la UE fue de 7.721 t en 2013, siendo notable el descenso de su producción en Portugal de 4.000 t en 2012 hasta una producción total de 440 t en 2013. Existen también producciones en Francia y Países Bajos, además de en otros países como Islandia y Dinamarca. A nivel mundial, según los datos de la FAO, China y Chile produjeron alrededor de 64.000 y 442 t de rodaballo en 2012, respectivamente. Con todo ello, la producción de rodaballo de acuicultura en el mundo habría ascendido a 77.117 t en 2012. Conviene destacar que sigue existiendo una parte importante del aprovisionamiento de esta especie que procede de la pesca extractiva europea (6.191 t en 2012), representando el rodaballo de crianza el 67,1% del total comercializado en ese año (APROMAR, 2014).

II.2. PRINCIPALES ICTIOPATOLOGÍAS EN ACUICULTURA Y MEDIDAS PARA SU CONTROL

La acuicultura es la industria que más crece a nivel mundial en el sector de la producción de alimentos y se perfila como la única estrategia para satisfacer la creciente demanda mundial de alimentos de origen acuático en un futuro próximo (FAO/NACA/WHO, 1999). Para lograr una alta producción acuícola, los sistemas de cultivo se han expandido, diversificado e intensificado en las últimas décadas, lo que ha provocado que los peces estén expuestos a numerosos factores de estrés (manejo, alta densidad de animales y cambios de temperatura y salinidad) que afectan negativamente a su salud (Brock y Bullis, 2001). En estas condiciones de producción, los peces son más vulnerables a una gran variedad de microorganismos patógenos y oportunistas (virus, parásitos, hongos y bacterias) que provocan altas mortalidades y, como consecuencia, grandes pérdidas económicas para el sector. En este contexto, la acuicultura se enfrenta en la actualidad a la problemática de la prevención y el control de las ictiopatologías, principalmente las de etiología bacteriana que se presentan sobre todo durante las etapas larvaria y de alevinaje y que suponen un importante obstáculo para el desarrollo de esta actividad. Asimismo, los peces pueden actuar como reservorios y vectores de bacterias patógenas para el hombre (*Photobacterium damsela*, *Listonella anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio vulnificus*, *Edwardsiella tarda*, *Mycobacterium marinum*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus parauberis* y *Lactococcus garvieae*) de gran relevancia para la Salud Pública y la seguridad alimentaria (Toranzo *et al.*, 2005; Lunestad *et al.*, 2007; EFSA, 2008b; Almeida *et al.*, 2009; Ringø *et al.*, 2010a; Chan *et al.*, 2011; Haenen *et al.*, 2013).

II.2.1. ICTIOPATOLOGÍAS DE ORIGEN VÍRICO

Entre las enfermedades víricas que afectan a las especies acuícolas marinas y continentales destacan las siguientes: (i) necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) causada por el virus homónimo (VNHI) que pertenece al género *Novirhabdovirus* y la familia Rhabdoviridae y que afecta a varias especies de salmónidos; (ii) septicemia hemorrágica viral (SHV), enfermedad originada por el virus homónimo (VSHV) que pertenece al género *Novirhabdovirus* y la familia Rhabdoviridae y que afecta a la trucha arcoíris, el rodaballo y el falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*); (iii) viremia de primavera de la carpa (VPC) causada por el virus homónimo (VVPC) que provisionalmente está adscrito al género *Vesiculovirus* y la familia Rhabdoviridae y que afecta a varias especies de carpas y en algunas otras especies de peces ciprínidos e ictalúridos; (iv) anemia infecciosa del salmón (AIS), enfermedad originada por el virus homónimo (VAIS) que pertenece a la familia Orthomyxoviridae y que afecta al salmón del Atlántico; (v) enfermedad del herpesvirus koi (EHVK) originada por el virus homónimo (HVK) que pertenece a la familia Herpesviridae y que afecta a la carpa común y otras

variedades, como la carpa koi; (vi) necrosis hematopoyética epizoótica (NHE) causada por el virus homónimo (VNHE) que pertenece al género *Ranavirus* y la familia Iridoviridae y que afecta a varias especies de peces, incluyendo la trucha arcoíris y la perca; (vii) iridovirosis de la dorada japonesa (*Pagrus major*) (IDJ) originada por el virus homónimo (IVDJ) que pertenece a la familia Iridoviridae y que afecta a más de 30 especies de peces marinos cultivados pertenecientes fundamentalmente a los órdenes Perciformes y Pleuronectiformes; (viii) necrosis nerviosa viral (NNV) (también denominada como enfermedad de la encefalopatía y retinopatía virales) causada por el virus homónimo (VNN) que pertenece a la familia Nodaviridae y que afecta a varias especies de peces marinos (jurel, lubina, perca, mero, lenguado, bacalao del Atlántico, halibut, etc.), y por último, (ix) enfermedad pancreática y enfermedad del sueño, originadas por varios subtipos de virus del género *Alphavirus* que pertenecen a la familia Togaviridae y que afectan a los salmónidos (Walker y Winton, 2010; Crane y Hyatt, 2011).

II.2.2. ICTIOPATOLOGÍAS DE ORIGEN PARASITARIO

Las enfermedades parasitarias que afectan a las especies acuícolas marinas y continentales se pueden dividir en siete grandes grupos: (i) enfermedades causadas por protozoarios endoparásitos, como la enfermedad del terciopelo o polvo dorado ocasionada por los dinoflagelados *Glenodinium* y *Oodinium*, la costeasis provocada por el ectoparásito *Ichtyobodo* y que afecta a carpas, lisas, bagres, tilapias y truchas, la hexamitiasis provocada por el flagelado del género *Hexamita* que afecta a truchas jóvenes, carpas y mojaras (*Diplodus vulgaris*), la criptobiasis originada por el flagelado del género *Cryptobia* y que afecta a carpas, la enfermedad del punto blanco provocada por el ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* y que habita bajo el epitelio de la piel, aletas y branquias de diversas especies de peces como carpas, bagre, truchas y mojaras, la epistiliasis causada por el ciliado del género *Epistylis*, la chilodoneleasis ocasionada por *Chilodonella* spp. y la trichodiniasis originada por *Trichodina* spp.; (ii) enfermedades causadas por protozoarios ectoparásitos, como la ceratomixosis ocasionada por *Ceratomyxa shasta* y que afecta principalmente a los salmónidos, la myxoboliasis ocasionada por el protozoario myxosporio *Myxobolus cerebralis* y que causa epizootias en ejemplares jóvenes de truchas y la pleistoforiasis originada por el género *Pleistophora* y que afecta también a la trucha arcoíris; (iii) enfermedades causadas por trematodos monogéneos (ectoparásitos), como la gyrodactirosis y la dactilogyrosis originadas por especies de los géneros *Gyrodactylus* y *Dactylogyrus*, respectivamente, y que afectan a diversas especies de peces, y por último, (iv) enfermedades causadas por trematodos digéneos, como la diplostomiasis provocada por la larva del trematodo *Diplostomulum*, la enfermedad de las manchas negras (neascusias) ocasionada por la metacercaria de trematodos del género *Neascus*, la clinostomiasis causada por las metacercarias del género *Clinostomum*, la sanguinicoliasis ocasionada por el trematodo del género *Sanguinicola* y la bucefalosis originada por larvas y adultos de *Bucephalus*; (v) enfermedades causadas por cestodos, como la proteocefalosis causada por los cestodos adultos del género *Proteocephalus*, la difilobotriasis causada por la larva

plerocercario de *Diphyllbothrium* en los peces acuícolas de agua dulce, la liguliasis causada por la larva plerocercario del cestodo *Ligula intestinalis*, la botriocefalosis causada por *Bothriocephalus* y que afecta a carpas y bagres, la triaenoforiosis causada por el cestodo del género *Triaenophorus* y que habitualmente parasita el intestino de bagres, truchas y carpas; (vi) enfermedades causadas por acantocéfalos de los géneros *Pomphorhynchus*, *Echinorhynchus* y *Neoechinorhynchus* y que ocasionan daños en peces de agua dulce, y (vii) enfermedades causadas por crustáceos, como la lernaeosis originada por *Lernaea*, la argulosis causada por *Argulus*; la ergasilosis causada por las hembras de *Ergasilus*, la salmincoliasis originada por la hembra de *Salmincola* y la acteresiasis causada por la hembra adulta de *Acthere* (Rodríguez Gutiérrez *et al.*, 2001; Álvarez-Pellitero, 2008; Abowei y Briyai, 2011).

II.2.3. ICTIOPATOLOGÍAS DE ORIGEN FÚNGICO

Las principales enfermedades fúngicas que afectan a las especies acuícolas marinas y continentales son la ictiofoniasis originada por *Ichthyophonus hoferi*, la saprolegniasis causada por *Saprolegnia parasitica* y la branquiomycosis originada por *Branchiomyces sanguinis* y *Branchiomyces demigrans*, que afectan a diferentes peces de agua dulce y salada (Rodríguez Gutiérrez *et al.*, 2001).

II.2.4. ICTIOPATOLOGÍAS DE ORIGEN BACTERIANO

Entre las ictiopatologías de etiología bacteriana que afectan a las especies acuícolas marinas y continentales destacan las producidas por los siguientes grupos de microorganismos: (i) bacilos Gram-negativos aerobios y anaerobios facultativos, entre los que se incluyen Enterobacteriáceas como *Yersinia* spp. (*Y. ruckeri*) y *Edwardsiella* spp. (*Ed. tarda*), Vibrionáceas como *Vibrio* spp. (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. splendidus*, *V. harveyi* and *V. campbellii*), *Listonella* spp. (*Ls. anguillarum* y *Ls. pelagia*), *Photobacterium* spp. (*Ph. damsela*) y *Aliivibrio* spp. (*Al. salmonicida*), Aeromonadáceas como *Aeromonas* spp. (*A. salmonicida* y *A. hydrophila*) y Pseudomonadáceas como *Pseudomonas* spp. (*Ps. fluorescens* y *Ps. anguilliseptica*); (ii) cocos y bacilos Gram-positivos como *Streptococcus* spp. (*St. iniae*, *St. parauberis*, *St. phocae* y *St. agalactiae*), *Lactococcus* spp. (*L. garvieae* y *L. piscium*), *Carnobacterium* spp. (*C. maltaromaticum*), *Vagococcus* spp. (*Vg. salmoninarum*) y *Renibacterium* spp. (*R. salmoninarum*); (iii) Micobacteriáceas (*M. marinum*) y Nocardíáceas; (iv) Flavobacterias como *Flavobacterium* spp. (*F. psychrophilum* y *F. columnare*) y *Tenacibaculum* spp. (*T. maritimum*), y (v) Piscirickettsias como *Piscirickettsia salmonis* (Padrós y Furones, 2002; Fryer y Hedrick, 2003; Ghittino *et al.*, 2003; Toranzo *et al.*, 2005).

II.2.4.1. Ictiopatologías de origen bacteriano que afectan al cultivo del rodaballo

Las infecciones más graves que afectan al cultivo del rodaballo en las últimas décadas son la vibriosis (*Ls. anguillarum* y *V. splendidus*), tenacibaculosis (*T. maritimum*), estreptococosis (*St. parauberis*), furunculosis (*A. salmonicida* subesp. *salmonicida*) y edwardselliosis (*Ed. tarda*).

II.2.4.1.1. Vibriosis

La vibriosis es una enfermedad en la que intervienen varias bacterias Gram-negativas pertenecientes a los géneros *Vibrio* y *Listonella* y que causa grandes pérdidas económicas en la acuicultura marina. Las principales especies de vibrios que afectan al cultivo del rodaballo son *Ls. anguillarum* (antes denominado *Vibrio anguillarum*) y *V. splendidus*. *Ls. anguillarum* es el agente etiológico de la vibriosis clásica y afecta principalmente a los juveniles. Los peces afectados muestran una septicemia generalizada con hemorragias en la base de las aletas, exoftalmia y opacidad de la córnea, así como una severa anemia. Los principales serotipos que han causado graves problemas de mortalidad en el rodaballo han sido O1 y O2 (con dos subgrupos, O2a y O2b) (Toranzo *et al.*, 2005). Actualmente, existen varias vacunas comerciales frente a *Ls. anguillarum* que incluyen en sus formulaciones el serotipo O1 o una mezcla de los serotipos O1 y O2a y que se administran por baño o inyección intraperitoneal (Toranzo *et al.*, 2005). Además, existe una vacuna (GAVA-3) que cubre los tres principales serotipos (O1, O2a y O2b) y que se administra por baño en peces de 1–2 g (Toranzo *et al.*, 2005). Por otra parte, *V. splendidus* es el agente etiológico de la vibriosis larvaria en rodaballo, relacionada con el empleo de alimento vivo (rotíferos o artemias) durante la fase larvaria que actúa como vía de entrada del patógeno al sistema digestivo de los peces (Thomson *et al.*, 2005; Macpherson *et al.*, 2012). Este microorganismo provoca septicemia y enteritis en las larvas de rodaballo, causando altas tasas de mortalidad debido a la producción de una hemolisina, denominada vibrioaerolisina (Macpherson *et al.*, 2012). Actualmente no existe ninguna vacuna frente a este ictiopatógeno.

II.2.4.1.2. Tenacibaculosis

La tenacibaculosis o flexibacteriosis es una enfermedad originada por *T. maritimum* (antes denominado *Flexibacter maritimus*) que afecta a un gran número de peces marinos de todas las edades. La tenacibaculosis es considerada como una de las enfermedades más importantes en la producción de rodaballo en acuicultura porque origina una alta mortalidad y grandes pérdidas económicas en este sector (Avendaño-Herrera *et al.*, 2006). *T. maritimum* es una bacteria Gram-negativa y filamentosa, que forma biopelículas (*biofilms*) y afecta a rodaballos adultos y juveniles, siendo estos últimos los que sufren la forma más severa de la enfermedad. Los rodaballos afectados por este microorganismo presentan lesiones ulcerativas y necróticas en toda la superficie del cuerpo, incluyendo lesiones en la boca y aletas y a veces también necrosis de las agallas y los ojos (Santos *et al.*, 1999; Avendaño-

Herrera *et al.*, 2005; Faílde *et al.*, 2013). La virulencia de *T. maritimum* está asociada con la captación de hierro en el hospedador a partir de la producción de sideróforos y de grupos hemo y con sistemas de comunicación del tipo *quorum sensing* que regulan la expresión de factores de virulencia (Avendaño-Herrera *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010). En la actualidad, sólo existe una vacuna (FM-95) para la prevención de la tenacibaculosis marina producida por *T. maritimum* en rodaballo y que se administra por baño en juveniles de 1–2 g y por inyección intraperitoneal a partir de los 30–40 g (Santos *et al.*, 1999). El uso regular de esta vacuna en granjas de rodaballos ha reducido la incidencia de esta enfermedad en los últimos años (Toranzo *et al.*, 2004).

II.2.4.1.3. *Streptococosis*

La estreptococosis está causada por la bacteria Gram-positiva *Streptococcus parauberis* y afecta a rodaballos de todas las edades provocando pérdidas económicas por el alto porcentaje de mortalidad y morbilidad. Los signos clínicos consisten en una pronunciada exoftalmia bilateral con hemorragia, acúmulo de pus en el globo ocular y en la base de las aletas pectorales, hemorragias en las aletas y petequias en el abdomen (Doménech *et al.*, 1996; Toranzo *et al.*, 2004). Actualmente existe una vacuna (ET-2²) que protege a los peces durante un período de dos años y que se administra por inyección intraperitoneal (Toranzo *et al.*, 1995; Romalde *et al.*, 1999; Toranzo *et al.*, 2004).

II.2.4.1.4. *Forunculosis*

La forunculosis está causada por la bacteria Gram-negativa *A. salmonicida* subesp. *salmonicida* y afecta principalmente a salmónidos pero también a rodaballos juveniles y adultos. Los peces afectados presentan septicemia hemorrágica y necrosis licuefactiva (Toranzo *et al.*, 2004). Actualmente existen varias vacunas que se administran por inyección intraperitoneal para prevenir esta enfermedad en rodaballos pero la protección sólo dura de tres a seis meses (Toranzo *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005; Toranzo *et al.*, 2005).

II.2.4.1.5. *Edwardsiellosis*

La edwardsiellosis está causada por la bacteria Gram-negativa *Ed. tarda* y se considera como un patógeno emergente del rodaballo ya que desde el año 2004 se ha extendido por varias plantas de cultivo de rodaballo europeas (Castro *et al.*, 2008). La mayoría de las lesiones macroscópicas que presentan los rodaballos afectados por este patógeno no son patognomónicas de esta enfermedad y consisten principalmente en lesiones en la dermis, exoftalmia y petequias en la boca y aletas (Padrós *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2012). Actualmente se han desarrollado de forma experimental dos vacunas diferentes que administradas por vía intraperitoneal confieren protección frente a este patógeno durante uno y seis meses (Lan *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2008; Toranzo, 2010).

II.2.4.2. Medidas de control

II.2.4.2.1. Antibióticos

Tradicionalmente se han utilizado los antibióticos (en muchas ocasiones de forma indiscriminada) como agentes terapéuticos y, en algunos casos, en los tratamientos profilácticos de las ictiopatologías de etiología bacteriana, tanto mediante su adición directa a los piensos como por inyección o inmersión de los peces en soluciones antibióticas; no obstante, cada vez existe una mayor reticencia a su empleo, no sólo por parte de las agencias sanitarias sino también por las propias piscifactorías y los consumidores, debido a sus posibles efectos perjudiciales para la salud animal y humana, la seguridad alimentaria y el medio ambiente. Entre estos efectos adversos pueden destacarse los siguientes: (i) aparición y transferencia de (multi)resistencias a antibióticos en la microbiota patógena de los peces, lo que conlleva un alto riesgo de incremento del número de epizootias; (ii) diseminación de estas resistencias al medio ambiente y a otros microorganismos, tanto bacterias patógenas del hombre, los peces y otros animales como bacterias saprófitas, que, a su vez, pueden actuar como reservorios de genes de resistencia a antibióticos, los cuales, mediante transferencia horizontal (*e.g.*, mediada por transposones o plásmidos), pueden ser adquiridos por bacterias productoras de enfermedades; (iii) presencia de residuos de antibióticos en los alimentos, que pueden provocar efectos toxicológicos, reacciones alérgicas y disbiosis intestinales en los consumidores y manipuladores de los peces y pescados, y (iv) acumulación de residuos de antibióticos procedentes de los piensos no ingeridos y las heces de los peces en el sedimento marino, lo que puede ejercer una presión selectiva que provoca la modificación de la microbiota y la selección de bacterias resistentes a estas sustancias antimicrobianas (FAO, 2005; Cabello, 2006; EFSA, 2008b).

En la década de los 70 y 80, los antibióticos más utilizados en acuicultura fueron el ácido oxolínico, oxitetraciclina, furazolidona, sulfamidas con trimetoprim y amoxicilina (Ringø *et al.*, 2014). En este sentido, se ha asociado el desarrollo de resistencias a antibióticos en un gran número de patógenos de peces (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Ed. tarda*, *Ls. anguillarum*, *Ph. damsela*, *Y. ruckeri*, *V. harveyi* y *F. psychrophilum*) con el uso de tratamientos antibióticos en la acuicultura, especialmente con el empleo de dosis subterapéuticas (Karunasagar *et al.*, 1994; De Paola *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 2000; Teo *et al.*, 2000; Hatha *et al.*, 2005; Orozova *et al.*, 2010). Las principales resistencias que se han observado incluyen a aquellos antibióticos que afectan a la síntesis de proteínas como oxitetraciclina, eritromicina, estreptomicina y cloranfenicol; inhibidores de la síntesis de la pared celular como ampicilina y penicilina; inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos como quinolonas; y por último, inhibidores de la síntesis de ácido fólico como las sulfamidas (Dixon, 1994; Karunasagar *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 2000; Teo *et al.*, 2000; Hatha *et al.*, 2005; Orozova *et al.*, 2010). La aparición y transferencia de genes de resistencias a antibióticos en los ictiopatógenos no sólo tiene repercusión en la ineffectividad de los tratamientos de las especies acuáticas cultivadas en las piscifactorías, sino que

además incrementa la posibilidad de transferir estos genes de resistencia a múltiples microorganismos, incluyendo los patógenos, de animales terrestres y de humanos y comprometiendo así los tratamientos terapéuticos en medicina humana (Cabello, 2006). Existen numerosos estudios que ponen de manifiesto la presencia de genes de resistencia en microorganismos patógenos de peces. Así Schmidt *et al.* (2000) detectaron genes de resistencia a la tetraciclina [*tet(A)*, *tet(E)*, *tet(D)*] en cepas de *Aeromonas* spp. aisladas de varias piscifactorías de trucha arcoíris en Dinamarca. Los genes *tet(A)* y *tet(E)* también fueron detectados por Miranda *et al.* (2003) en cepas de *Ps. fluorescens* y *A. hydrophila* aisladas de piscifactorías de salmón en Chile. Dang *et al.* (2007) detectaron genes de resistencia a la tetraciclina [*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(M)* y *tet(D)*] y cloranfenicol (*cat II* y *floR*) en cepas de *V. splendidus* y *Pseudoalteromonas* spp. aisladas de agua de los estanques de cultivo de oreja de mar (*Haliotis discus hannai*) y rodaballo en China. Por otra parte, Cattoir *et al.* (2007) sugirieron que *V. splendidus* podría ser el reservorio del plásmido que contiene el gen que confiere resistencia a las quinolonas (*qnrS*). Otro estudio desarrollado por Ishida *et al.* (2010) puso de manifiesto la presencia de genes de resistencia a la tetraciclina [*tet(A)*, *tet(C)*, *tet(D)*] en cepas de *A. hydrophila* y *V. alginolyticus* y también de genes de resistencia a β -lactámicos (*bla_{TEM}*), quinolonas (*qnrS*), cloranfenicol (*catB3*) y trimetoprim (*dfrA1* y *dfrA2*) en cepas de *A. hydrophila* aisladas en piscifactorías de agua salobre de lisas y tilapias en Egipto. Además, diversos estudios epidemiológicos y moleculares han demostrado, por ejemplo, la transferencia de resistencias antibióticas desde bacterias patógenas de peces (*e.g.*, *A. salmonicida* y *Ls. anguillarum*) a especies patógenas para el hombre de gran relevancia, como, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio cholerae* (Cabello, 2006; Defoirdt *et al.*, 2011). Por todo ello, en la UE, EE.UU., Canadá, Japón y la mayoría de los países industrializados se han desarrollado regulaciones cada vez más restrictivas sobre el empleo de antibióticos en acuicultura, que incluyen, por ejemplo, la prohibición de su empleo como tratamiento profiláctico, la restricción del número de antibióticos autorizados como terapéuticos, el control de su prescripción veterinaria, el establecimiento y vigilancia de límites máximos de residuos (LMR) y la prohibición expresa del empleo de determinados antibióticos por su elevada toxicidad o por su importancia en medicina humana y su capacidad para generar resistencias (FAO, 2005; Cabello, 2006; EFSA, 2008a, 2008b). Según la FAO, los antibióticos autorizados para su empleo como tratamiento terapéutico de enfermedades bacterianas en acuicultura son: oxitetraciclina, florfenicol, sarafloxacin, eritromicina y sulfamidas con trimetoprim u ormetoprim (FAO, 2005). En la UE, los principales antibióticos autorizados para su empleo como tratamiento terapéutico de enfermedades bacterianas en acuicultura son: amoxicilina, florfenicol, flumequina, ácido oxolínico, oxitetraciclina, sarafloxacin y sulfamidas con trimetoprim (EFSA, 2008a; Rodgers y Furones, 2009).

II.2.4.2.2. Alternativas al empleo de antibióticos

Como consecuencia de lo expuesto anteriormente, cada vez es mayor el interés por la investigación y el desarrollo de metodologías alternativas al empleo de antibióticos que no sólo resulten eficaces para el control de las ictiopatologías de origen bacteriano sino que, además, sean seguras, respetuosas con el medio ambiente y cuya aplicación resulte sencilla y rentable económicamente. En este contexto, está adquiriendo una creciente relevancia el empleo de vacunas e inmunoestimulantes, probióticos/prebióticos y bacteriófagos como sustitutos de la quimioterapia para el biocontrol de microorganismos patógenos (Gatesoupe, 1999; Verschuere *et al.*, 2000b; Nakai y Park, 2002; Mathur *et al.*, 2003; Bricknell y Dalmo, 2005; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Yousefian y Amiri, 2009; Ringø *et al.*, 2010b, 2014; Defoirdt *et al.*, 2011; Brudeseth *et al.*, 2013; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2014). A continuación se detallan brevemente las principales estrategias alternativas al empleo de los antibióticos para el control de las ictiopatologías de origen bacteriano.

II.2.4.2.2.1. Vacunas e inmunoestimulantes

El desarrollo de vacunas en peces tiene una historia reciente, ya que la primera vacuna comercializada en peces salió al mercado en EE.UU. en el año 1976 para proteger a los salmónidos frente a la yersiniosis o enfermedad entérica de la boca roja (ERM, del inglés *Enteric Red Mouth Disease*) causada por *Y. ruckeri* (Ringø *et al.*, 2014). A partir de ese momento, la industria se expandió rápidamente, lo que permitió que a principios de la década de los 90 estuvieran disponibles diversas vacunas para su empleo en acuicultura frente a distintos ictiopatógenos (FAO, 2005). Como en otras especies animales, el objetivo de la vacunación es conseguir estimular la respuesta inmune de los peces para lograr la producción de anticuerpos frente a los ictiopatógenos (FAO, 2005). Sin embargo, a diferencia de los animales terrestres, existen tres métodos para administrar vacunas a los peces (inmersión por baño o con *spray*, inyección o vía oral) que se emplean dependiendo de la especie diana, manejo, coste, estrés para los peces, tasa de supervivencia, dosis y duración de la protección (FAO, 2005). Actualmente existen vacunas disponibles para un gran número de peces cultivados (salmón Atlántico, salmón del Pacífico [*Oncorhynchus kisutch*], trucha arcoíris, medregal del Japón [*Seliora quinquerediata*], ayu [*Plecoglossus altivelis*], lubina, dorada, tilapia, bacalao del Atlántico, rodaballo, falso halibut del Japón, pez gato sutchi o panga [*Pangasianodon hypophthalmus*], bagre de canal [*Ictalurus punctatus*]) frente a enfermedades de origen bacteriano como vibriosis (*V. anguillarum* y *V. ordalii*), vibriosis de agua fría (*V. salmonicida*), forunculosis (*A. salmonicida* subesp. *salmonicida*), yersiniosis (*Y. ruckeri*), pasteurelosis (*Ph. damsela* subesp. *piscicida*), flavobacteriosis (*F. columnare*), piscirickettsiosis (*Pc. salmonis*), edwardsiellosis (*Ed. ictaluri*), tenacibaculosis (*T. maritimum*), estreptococosis (*St. iniae*) y lactococosis (*L. garvieae*) (Brudeseth *et al.*, 2013; Ringø *et al.*, 2014).

La vacunación constituye, en principio, el método ideal para prevenir las ictiopatologías, pero su aplicación está dificultada por, entre otras, las siguientes circunstancias: (i) el limitado número de vacunas comerciales efectivas en el mercado; así, por ejemplo, no se dispone de vacunas, o estas no son efectivas, para evitar las infecciones debidas a, entre otros ictiopatógenos, *St. parauberis*, *F. psychrophilum*, *F. columnare*, *A. hydrophila*, *Ps. anguilliseptica*, *Ed. tarda*, *Mycobacterium marinum* o *Candidatus arthromitus* (causante del síndrome entérico en trucha); (ii) la variación de su efectividad dependiendo de la especie acuícola en la que se empleen; (iii) el grado de protección que ofrecen, frecuentemente muy limitado en el tiempo (*e.g.*, 3–6 meses) y, generalmente, sólo frente a determinadas especies (y, en muchos casos, serotipos) patógenas; (iv) el elevado coste; (v) la problemática de su aplicación en las etapas larvarias, tanto por la inmadurez de su sistema inmune como por la dificultad de su manejo; (vi) el retardo del crecimiento que pueden ocasionar; (vii) la disminución de su eficacia cuando no se emplean inmunoestimulantes o por diversos factores (*e.g.*, tamaño de los peces, tipo de adyuvantes adicionados en su formulación y salinidad); (viii) la limitación de su eficacia cuando los peces padecen otras enfermedades simultáneamente; (ix) las alteraciones que pueden provocar en la calidad del producto (*e.g.*, adherencias, inflamación crónica y melanosis), y, por último, (x) el estrés que su empleo provoca en los peces, especialmente cuando se administran mediante inyección intraperitoneal, con la consiguiente repercusión en su respuesta inmune y, por lo tanto, en su productividad (EFSA, 2008a; Toranzo *et al.*, 2009).

Los inmunoestimulantes empleados en acuicultura son compuestos que modulan el sistema inmune innato de los peces para mejorar su respuesta inmune frente a los ictiopatógenos y prevenir así las enfermedades (Bricknell y Dalmo, 2005). Los inmunoestimulantes que se han estudiado en peces se pueden dividir en diferentes grupos según su naturaleza: agentes químicos (levamisol y lactoyl tetrapéptido FK-156), componentes bacterianos (lipopolisacárido, peptidoglicano, muramil dipéptido y adyuvante de Freund), extractos de animales, plantas o algas (alginato, Ergosan, glicirricina, etc), factores nutricionales (vitaminas C y E), citoquinas (interferón) y lactoferrina (Sakai, 1999). Estos inmunoestimulantes pueden ser administrados en los peces por inmersión, por vía oral como suplementos alimenticios y por inyección como adyuvante junto con las vacunas (Sakai, 1999; Bricknell y Dalmo, 2005; Tafalla *et al.*, 2013). A este respecto, a pesar de que hay evidencias de los efectos beneficiosos del empleo de los inmunoestimulantes en acuicultura, la mayoría de los productos comerciales que se emplean actualmente son derivados de levaduras (*e.g.*, β 1-3 y β 1-6 glucanos) y el Ergosan, que es un alimento complementario extraído de algas marinas con un alto contenido en alginatos y polisacáridos. Peddie *et al.* (2002) demostraron que una única dosis de Ergosan (1 mg) por vía intraperitoneal aumentaba significativamente la proporción de neutrófilos, la fagocitosis, el estallido respiratorio y la expresión de la interleuquina-1 β (IL-1 β) y la interleuquina-8 (IL-8) y una de las dos isoformas del factor de necrosis tumoral- α (TNF2) en leucocitos peritoneales de trucha arcoíris a las 24 h de su administración. Asimismo, se ha demostrado que el empleo de los inmunoestimulantes

como adyuvantes en las vacunas, especialmente β 1-3 y β 1-6 glucanos, activan la respuesta inmune específica de los peces sin observarse ningún efecto adverso (Anderson, 1997). Además, la inmunoestimulación de las larvas de peces se ha propuesto como un método para mejorar la supervivencia en esta etapa por la activación de la respuesta inmune innata (Bricknell y Dalmo, 2005).

II.2.4.2.2.2. Probióticos

El término probiótico fue definido por primera vez por Fuller (1989) como “microorganismos vivos que en forma de suplementos alimentarios afectan beneficiosamente al hospedador mediante una mejora de su equilibrio intestinal”. Actualmente, de acuerdo a la definición de la FAO y la Organización Mundial de la Salud (OMS; WHO, del inglés *World Health Organization*), los probióticos se consideran como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedador (FAO, 2002). Los probióticos han abierto una nueva era en la estrategia profiláctica y terapéutica en medicina humana y veterinaria, incluyendo los peces, moluscos y crustáceos, considerándose, por tanto, como una alternativa para el control de ictiopatologías en acuicultura (sección II.3).

II.2.4.2.2.3. Prebióticos

En los últimos años se está destacando la importancia y el interés de la evaluación del empleo de prebióticos como complementos alimenticios promotores de la salud de las especies de interés en acuicultura. A este respecto el término “prebiótico” hace referencia a sustancias o productos no digeribles como, por ejemplo, los oligosacáridos, entre los que se incluyen los fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), manano-oligosacáridos (MOS), arabinosilano-oligosacáridos (AXOS) y chito-oligosacáridos (COS), y los polisacáridos como la inulina (fructano de cadena larga) y β -glucanos (polisacáridos de D-glucosa unidos por enlaces β -glucosídicos) que: (i) sirven de sustrato para bacterias beneficiosas del tracto gastrointestinal y estimulan su crecimiento o actividad metabólica, (ii) modifican favorablemente la microbiota intestinal, y, por último, (iii) ejercen efectos beneficiosos en el hospedador, tanto a nivel sistémico como intestinal (Gibson y Roberfroid, 1995; Yousefian y Amiri, 2009; Song *et al.*, 2014). Uno de los principales efectos de los prebióticos estudiados en la acuicultura es el efecto sobre el sistema inmunitario inespecífico de los peces, moluscos y crustáceos. De hecho, los oligo- y polisacáridos han sido denominados como inmunosacáridos debido a su capacidad para activar el sistema inmunitario (Kocher, 2004). En acuicultura, se ha observado que estos inmunosacáridos presentan la capacidad de estimular el sistema inmune innato mediante diversos mecanismos, entre los que se incluyen el aumento de la actividad fagocítica, del estallido respiratorio y de la actividad de la lisozima en leucocitos de varias especies de salmónidos, ciprínidos, acipenséridos, esciénidos, morónidos, pleuronectiformes y crustáceos (Song *et al.*, 2014). Conviene destacar que la inclusión de prebióticos en la dieta de las especies de acuicultura

puede llevarse a cabo de forma independiente o conjuntamente con los cultivos de bacterias probióticas, esto es, en forma de preparaciones simbióticas, lo que puede favorecer la capacidad de colonización de los microorganismos probióticos y/o su supervivencia y, por lo tanto, el desarrollo de sus efectos beneficiosos (Teitelbaum y Walker, 2002; Mahious *et al.*, 2006).

II.2.4.2.2.4. Bacteriófagos

Los bacteriófagos, virus capaces de infectar, multiplicarse y provocar la lisis celular de forma específica en bacterias, se consideran actualmente como una alternativa a los antibióticos para la inactivación de los ictiopatógenos en acuicultura (Romero *et al.*, 2012). Desde su descubrimiento en 1915, los bacteriófagos han sido estudiados por sus propiedades terapéuticas y por su capacidad de controlar infecciones bacterianas. Sin embargo, estos estudios fueron abandonados por el descubrimiento de los antibióticos como tratamiento de las enfermedades infecciosas. Recientemente, debido al aumento de las resistencias bacterianas a los antibióticos, la fagoterapia ha reaparecido como alternativa al empleo de antibióticos en medicina humana y veterinaria (Romero *et al.*, 2012). Los bacteriófagos, a diferencia de los antibióticos, presentan las ventajas de que tienen especificidad por una determinada bacteria sin afectar a la microbiota intestinal normal del hospedador, se pueden replicar por ellos mismos en la bacteria diana eliminando la necesidad de su administración repetida y pueden penetrar en cualquier tejido infectado (Nakai y Park, 2002; Mathur *et al.*, 2003). En este sentido, se han realizado varios estudios que han mostrado los efectos terapéuticos y profilácticos de bacteriófagos con aplicación en acuicultura (Nakai *et al.*, 1999; Imbeault *et al.*, 2006; Vinod *et al.*, 2006). El primer estudio de fagoterapia en acuicultura fue realizado por Nakai *et al.* (1999) y demostró la capacidad de fagos en la prevención de la infección por *L. garvieae* en el medregal del Japón. En otro estudio descrito por Vinod *et al.* (2006) se aisló un bacteriófago con actividad lítica frente a *V. harveyi* que mejoró la supervivencia de larvas de langostino jumbo infectadas con este patógeno. Por otra parte, Imbeault *et al.* (2006) demostraron que el bacteriófago HER110 retrasa la forunculosis originada por *A. salmonicida* y reduce la mortalidad ocasionada en la trucha de manantial o de arroyo (*Salvelinus fontinalis*). A pesar de los avances obtenidos en los últimos años, la fagoterapia también presenta limitaciones como su coste, la posible rápida liberación de endotoxinas bacterianas debido al efecto lítico del fago, el riesgo de que los fagos puedan mediar en el intercambio de material genético entre bacterias y presenten factores de virulencia, la reducción de la eficacia por el desarrollo de anticuerpos del hospedador frente a los fagos y por último, la aparición de resistencias bacterianas a los fagos (Mathur *et al.*, 2003; Defoirdt *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2012).

II.2.4.2.2.5. Otras alternativas

Otras alternativas que se han propuesto para el control de las ictiopatologías de origen bacteriano en acuicultura son: (i) el empleo de ácidos grasos de cadena corta y polihidroxialcanoatos para inhibir

el crecimiento de ictiopatógenos como *V. campbellii*; (ii) la fototerapia o terapia basada en la fotodinámica, que permite la generación de radicales reactivos de oxígeno y otros compuestos antimicrobianos tras la excitación lumínica de fotosensores naturales o sintéticos (*e.g.*, colorantes orgánicos o derivados porfirínicos); y, por último, (iii) la terapia con furanonas halogenadas, basada en la interrupción del sistema de comunicación entre bacterias patógenas (sistema *quorum sensing*) mediante la interacción con los reguladores de respuesta o la degradación enzimática de compuestos de bajo tamaño molecular que permiten la expresión de, por ejemplo, los genes relacionados con la formación de biopelículas (*biofilms*) y con diversos factores de virulencia requeridos para la infección del hospedador, como se ha observado en *Ls. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus* (Rasch *et al.*, 2004; Defoirdt *et al.*, 2006, 2011; Almeida *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2010; Natrah *et al.*, 2011).

II.3. PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA

II.3.1. DEFINICIÓN DE PROBIÓTICOS

En los sistemas de acuicultura, la interacción entre la microbiota y el hospedador no está limitada al tracto gastrointestinal, sino que las bacterias pueden ser activas también en las agallas y en la piel del hospedador o en su medio ambiente acuático. Por lo tanto, los probióticos para la acuicultura se consideran como cultivos microbianos vivos que ejercen un efecto beneficioso en el hospedador mediante: (i) la modificación de su microbiota y/o la de su medio ambiente; (ii) el incremento de la eficiencia en la asimilación del alimento y/o de su valor nutritivo; (iii) el incremento de la resistencia del hospedador frente a las enfermedades; y/o (iv) el incremento de la calidad del medio ambiente acuático en el que se desarrolla el hospedador (Verschuere *et al.*, 2000b). Con base en esta definición, los probióticos pueden incluir cultivos microbianos que: (i) previenen la proliferación de microorganismos patógenos en el tracto intestinal y las mucosas superficiales de los animales acuáticos, en las superficies de las piscifactorías y en el ambiente de cultivo; (ii) aseguran un aprovechamiento óptimo del alimento mediante su ayuda a la digestión (estimulación del crecimiento); (iii) mejoran la calidad del agua y/o (iv) estimulan el sistema inmune del hospedador (Verschuere *et al.*, 2000b). Por todo ello, los tratamientos probióticos en acuicultura pueden considerarse como: (1) métodos de biocontrol y biorremediación, ya que permiten la introducción de microorganismos que, mediante diferentes mecanismos, (i) posibilitan que los microorganismos patógenos puedan ser eliminados o reducidos en número en el ambiente acuícola; (ii) reducen la formación de biopelículas (*biofilms*) causadas por bacterias y hongos en las instalaciones (*biofouling*) y/o (iii) actúan como biorreactores y permiten el reciclaje de nutrientes (nitrógeno, fósforo y otras sustancias biodegradables) debido a la posibilidad de emplear el agua de desecho de las instalaciones para su crecimiento; así como (2) probióticos *sensu stricto*, ya que, entre otros efectos beneficiosos, favorecen que el

hospedador se encuentre en un adecuado estado inmune para combatir al microorganismo patógeno (Chabrállón y Moríño, 2007; Panigrahi y Azad, 2007).

II.3.2. SELECCIÓN DE PROBIÓTICOS

La selección y el desarrollo de cultivos de microorganismos aplicables comercialmente en acuicultura como probióticos constituye un proceso multidisciplinar que incluye diferentes etapas en las que resultan necesarias la investigación básica y aplicada, así como diversos ensayos a escalas piloto y real y estudios de viabilidad económica (Verschuere *et al.*, 2000b). Actualmente no existen directrices nacionales o internacionales específicas acerca de la evaluación de probióticos para su empleo en la acuicultura. Sin embargo, existen recomendaciones internacionales generales para la evaluación del empleo de probióticos en los alimentos, como las que se reflejan en el documento denominado *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, preparado por una Comisión Conjunta de Expertos de la FAO y la OMS (FAO, 2002). A este respecto, en este documento se incluyen las siguientes etapas: (1) identificación taxonómica del microorganismo mediante pruebas genotípicas y fenotípicas; (2) caracterización funcional del microorganismo (*in vitro* e *in vivo*); (3) evaluación de su seguridad (*in vitro* e *in vivo*), que incluye, al menos, la evaluación de su (i) resistencia a antibióticos, (ii) presencia de factores de virulencia o producción de toxinas, (iii) actividad hemolítica y (iv) ciertas actividades metabólicas (*e.g.*, producción de D-lactato, desconjugación de la bilis, etc.); (4) determinación de su eficacia y confirmación de los resultados y, por último, (5) etiquetado, presentación y publicidad. Asimismo, en la UE también existen diversos documentos publicados por, entre otros, el *Scientific Committee for Animal Nutrition* (SCAN) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, del inglés *European Food Safety Authority*) acerca del estatus QPS (del inglés *Qualified Presumption of Safety*) en el que incluye la evaluación de la seguridad de los microorganismos empleados en los alimentos y piensos, su identificación y filiación taxonómica y su resistencia a los antibióticos de importancia clínica (EFSA, 2005a, 2005b, 2007, 2011, 2012a, 2012b). Además, actualmente existen también varias recomendaciones recogidas en la reciente literatura científica sobre este tema de acuciente interés y actualidad e indudable importancia para la Salud Pública y la protección medioambiental (Saarela *et al.*, 2000; von Wright, 2005; Vine *et al.*, 2006; Ogier y Serror, 2008; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). Por tanto, de forma general, la selección de microorganismos para su empleo como probióticos se basa, en primer lugar, en el aislamiento de probióticos potenciales, preferentemente procedentes del hospedador en el que se pretenden emplear o del ambiente acuático en el que deben ejercer su efecto beneficioso y, posteriormente, en la evaluación del grado de cumplimiento de tres requisitos fundamentales relacionados con: (i) la seguridad, (ii) las propiedades funcionales y probióticas (eficacia) y (iii) las características tecnológicas (Saarela *et al.*, 2000; von Wright, 2005; Vine *et al.*, 2006; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014).

II.3.2.1. Evaluación de la seguridad

En el proceso de selección de cepas probióticas reviste una gran importancia la evaluación de su seguridad, en la que se deben incluir las siguientes etapas: (i) identificación y filiación taxonómica, (ii) evaluación *in vitro* de su actividad hemolítica, (iii) detección de los genes involucrados en la síntesis de diversos factores de virulencia, (iv) evaluación de su sensibilidad/resistencia a diversos antibióticos empleados en medicina humana y veterinaria y la detección de genes de resistencia transmisibles, (v) evaluación de actividades enzimáticas (*e.g.*, producción de aminas biógenas, actividad mucinolítica, etc.), y por último, (vi) evaluación *in vivo* de su seguridad en el hospedador (tasa de supervivencia) (Saarela *et al.*, 2000; von Wright, 2005; EFSA, 2005b, 2012a, 2012b). El desarrollo de esta etapa tiene una gran importancia desde el punto de vista de la seguridad y aplicación potencial de microorganismos como probióticos, ya que permite seleccionar *a priori* las cepas susceptibles de ser consideradas seguras para el consumo humano y animal (estatus GRAS, del inglés *Generally Recognized As Safe*), establecido por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) de EE.UU., o su equivalente europeo (estatus QPS) establecido por la EFSA (EFSA, 2005a, 2005b, 2007). A pesar de que las guías internacionales no estén enfocadas para la acuicultura, sus recomendaciones deberían ser un precedente para conducir la evaluación de la seguridad de probióticos en este área (Martínez Cruz *et al.*, 2012). Actualmente, la literatura científica muestra que la mayoría de estudios en los que se caracterizan probióticos para su empleo en acuicultura están más enfocados al estudio de las características funcionales y fisiológicas que a su seguridad, siendo la identificación y filiación taxonómica, la evaluación de la sensibilidad/resistencia a antibióticos y/o la evaluación *in vivo* de la tasa de supervivencia de la especie acuícola en la que se pretende emplear las cepas probióticas los ensayos más realizados con respecto a la seguridad (Irianto y Austin, 2002; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011a).

II.3.2.2. Evaluación de las propiedades funcionales y probióticas (eficacia)

Los probióticos deben presentar una serie de propiedades funcionales y probióticas (eficacia) que le permitan ejercer su efecto beneficioso en el hospedador. De forma general, el desarrollo de probióticos eficaces para su empleo en acuicultura incluye: (i) evaluación *in vitro* de su actividad antimicrobiana frente a los microorganismos patógenos que se pretenden controlar; (ii) evaluación de su capacidad para sobrevivir en el ambiente acuático o durante el tránsito por el tracto gastrointestinal del hospedador (*e.g.*, resistencia a las sales biliares, pH bajo y proteasas), así como de su capacidad para colonizar el intestino o una superficie externa del hospedador, mediante su adherencia a las células epiteliales y mucosas, y prevenir el establecimiento de bacterias potencialmente patógenas; y (iii) evaluación *in vivo* de sus efectos fisiológicos en el hospedador, entre los que se incluyen el efecto en su crecimiento (estado nutricional) y sistema inmune, así como ensayos en los que el hospedador se

infecta experimentalmente con el patógeno que se pretende controlar (Nikoskelainen *et al.*, 2001a; Chythanya *et al.*, 2002; Irianto y Austin, 2002; Chabrillón *et al.*, 2005; Salinas *et al.*, 2005; Kim y Austin, 2006a; Panigrahi *et al.*, 2007; Balcázar *et al.*, 2007b, 2008; Castex *et al.*, 2008; Díaz-Rosales *et al.*, 2009; Hai *et al.*, 2009; Caipang *et al.*, 2010; Ferguson *et al.*, 2010; Lazado *et al.*, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b; Liu *et al.*, 2012; Román *et al.*, 2012; Sica *et al.*, 2012; Zokaeifar *et al.*, 2012).

II.3.2.3. Evaluación de las características tecnológicas

En la última etapa de selección de probióticos es conveniente evaluar sus características tecnológicas, tales como su resistencia y viabilidad bajo condiciones de crecimiento y almacenamiento estándar y tras los procesos industriales empleados generalmente (*e.g.*, liofilización, extrusión, etc.), resistencia a fagos y producción a gran escala. Por último, es recomendable realizar análisis de costes y beneficios para asegurar su viabilidad económica y distribución comercial (Saarela *et al.*, 2000; Verschuere *et al.*, 2000b; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014).

II.3.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

Los principales mecanismos por los que los probióticos ejercen su efecto beneficioso son: (i) supresión de microorganismos patógenos mediante exclusión competitiva mediada por (1) la producción de compuestos antimicrobianos bacteriostáticos o bactericidas (*e.g.*, péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal denominados bacteriocinas (sección II.4.2.1.), ácidos orgánicos, enzimas (lisozimas y proteasas), sideróforos, peróxido de hidrógeno, lisozima, amonio y/o diacetilo), (2) la competencia por los nutrientes y energía disponibles y/o (3) la competencia por los lugares de adhesión del intestino u otras superficies mucosas; (ii) mejora de la nutrición del hospedador debida al suministro de nutrientes (*e.g.*, ácidos grasos, vitaminas y aminoácidos esenciales) y/o al favorecimiento de la digestión (*e.g.*, producción de lipasas y proteasas); (iii) mejora de la respuesta inmune del hospedador (*e.g.*, activación de la respuesta humoral, incremento de la actividad fagocítica y estallido respiratorio, etc.), y (iv) mejora de la calidad del agua de cultivo (*e.g.*, conversión de materia orgánica en dióxido de carbono, reducción de los niveles de amonio o nitritos, etc.) (Verschuere *et al.*, 2000b; Balcázar *et al.*, 2006).

II.3.3.1. Exclusión competitiva

El mecanismo de exclusión competitiva es el fenómeno mediante el cual la microbiota establecida previene o reduce la colonización de otros microorganismos oportunistas y patógenos (Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). A continuación se detallan varios mecanismos de exclusión competitiva.

II.3.3.1.1. Producción de compuestos antimicrobianos

Uno de los principales mecanismos de exclusión competitiva ejercida por los probióticos, que a su vez tiene una importante implicación en el control de patógenos en acuicultura, es la producción de compuestos antimicrobianos. El primer estudio en el que se tuvo constancia de que bacterias de origen marino presentaban actividad antimicrobiana frente a *Vibrio* spp. fue descrito por De Giaksa (1889). Más tarde, Rosenfeld y Zobell (1947) investigaron la producción de compuestos bacteriostáticos o bactericidas en microorganismos de origen marino que mostraban actividad antimicrobiana frente a microorganismos no marinos. A partir de estos estudios, se despertó un gran interés en los microorganismos de origen acuático con capacidad de sintetizar compuestos antimicrobianos. Hasta la fecha, se han descrito numerosos microorganismos pertenecientes a distintos géneros y especies (*Bacillus* spp., *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Carnobacterium* spp., *Micrococcus luteus*, *A. hydrophila*, *Ps. fluorescens*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *Roseobacter* spp., *Phaeobacter gallaeciensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. exiguus* y *Phaffia rhodozyma*) con actividad antimicrobiana frente a ictiopatógenos (Verschuere *et al.*, 2000b; Balcázar *et al.*, 2006; Martínez Cruz *et al.*, 2012; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). De forma general, esta actividad antimicrobiana se debe a la producción de bacteriocinas (sección II.4.2.1), ácidos orgánicos, enzimas (lisozima y proteasas), sideróforos, peróxido de hidrógeno, amonio y/o diacetilo (Verschuere *et al.*, 2000b).

II.3.3.1.2. Competencia por los nutrientes

Otro mecanismo de exclusión competitiva ejercida por los probióticos es la competición por nutrientes que tiene lugar a nivel del tracto intestinal y/o del medio ambiente acuático de las especies acuáticas cultivadas. Sin embargo, hasta la fecha hay pocos estudios que hayan demostrado este mecanismo de competición. Rico-Mora *et al.* (1998) demostraron que una cepa bacteriana del género *Aeromonas* que presentaba crecimiento activo en sustratos deficientes en nutrientes y que no presentaba actividad antimicrobiana frente a *V. alginolyticus*, prevenía la colonización de este ictiopatógeno en cultivos de diatomeas por exclusión competitiva por los nutrientes. Asimismo, Verschuere *et al.* (2000b) sugirieron que varias bacterias seleccionadas por su efecto positivo en la supervivencia y crecimiento de artemia protegían a este crustáceo frente a *V. alginolyticus* por competición con este patógeno por los nutrientes disponibles.

II.3.3.1.3. Competencia por los lugares de adhesión

Otro mecanismo por el que los probióticos previenen la colonización de patógenos es la competición por los lugares de adhesión en el intestino y otras superficies mucosas. La capacidad de las cepas probióticas para colonizar el intestino y adherirse a distintas superficies mucosas (piel y

agallas) sin causar enfermedad en el hospedador es considerada como un buen criterio para la selección de probióticos, ya que por la competición por los sitios de adhesión evitaría la etapa inicial de infección de los patógenos (Balcázar *et al.*, 2006; Vine *et al.*, 2006). La adhesión de los microorganismos a las superficies mucosas puede ser de forma inespecífica (uniones por enlaces no covalentes o interacciones hidrofóbicas) o específica (mediada por adhesinas que se expresan en la superficie de la pared bacteriana y receptores de las células epiteliales) (Verschuere *et al.*, 2000b; Nikoskelainen *et al.*, 2001a; Balcázar *et al.*, 2008). En este sentido, la inhibición de la adhesión de los patógenos al mucus de los peces ha sido demostrada *in vitro* por varios autores. Chabrilón *et al.* (2005) observaron que tres bacterias Gram-negativas, entre las que se incluyeron dos Vibrionáceas (51M6 y Pdp11) y una Pseudomonácea (Pdp9) reducían la adhesión de *Ph. damsela* subesp. *piscicida* al mucus de intestino de lenguado. De forma similar, Balcázar *et al.* (2008) demostraron que tres bacterias lácticas (*L. lactis* CLFP101, *Lactobacillus plantarum* CLFP238 y *Lb. fermentum* CLFP242) inhibían la adhesión de varios patógenos de peces (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Y. ruckeri* and *Ls. anguillarum*) al mucus de intestino de la trucha arcoíris.

II.3.3.2. Mejora de la nutrición del hospedador

Los probióticos pueden tener también un efecto directo sobre el crecimiento del hospedador al mejorar su nutrición por el suministro de nutrientes (*e.g.*, ácidos grasos, vitaminas y aminoácidos esenciales) y/o favorecer la digestión (*e.g.*, producción de lipasas y proteasas) (Ringø y Gatesoupe, 1998; Vine *et al.*, 2006). Varios estudios *in vivo* han demostrado que la adición de probióticos al pienso mejora la ganancia de peso en los peces debido a un incremento en la absorción de los nutrientes. Merrifield *et al.* (2010a) demostraron que ejemplares de trucha arcoíris alimentadas con *B. subtilis* y *B. licheniformis* durante 10 semanas presentaban mejores índices de conversión y crecimiento. También se ha demostrado una mejoría en el crecimiento de tilapias alimentadas con dietas suplementadas con distintas cepas probióticas (*S. cerevisiae*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Micrococcus luteus*, *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus* y *E. faecium*) (Welker y Lim, 2011). Sin embargo, Hidalgo *et al.* (2006) observaron que cuando los juveniles de dentón común (*Dentex dentex*) se alimentaban con una dieta suplementada con *Bacillus cereus* y *B. toyoi*, el crecimiento de los peces fue mayor que el de los peces alimentados con la dieta normal, aunque no de forma significativa. En otro estudio realizado en larvas de lubina alimentadas con la levadura *Debaryomyces hansenii* se observó un aumento de la expresión de los transcritos de la tripsina y la lipasa y también de la actividad de estas enzimas en los segmentos pancreáticos, sugiriendo que el efecto positivo de esta levadura en el desarrollo de las larvas podría ser atribuido a las poliaminas que intervienen en la maduración pancreática secretadas por esta levadura en el intestino de los peces (Tovar-Ramírez *et al.*, 2004).

II.3.3.3. Modulación del sistema inmune

Entre los numerosos beneficios de los probióticos, la modulación del sistema inmune innato y específico (Fig. 2.6) es uno de los efectos que más se ha estudiado en diferentes especies de peces y crustáceos utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* (Sharifuzzaman y Austin, 2009; Nayak, 2010). Estos estudios han demostrado que algunos probióticos presentan la capacidad de modular: (i) la producción de citoquinas, (ii) la actividad fagocítica, (iii) el estallido respiratorio, (iv) la actividad peroxidasa, (v) la producción de lisozima, (vi) la actividad del complemento y (vii) la producción de inmunoglobulinas (Harikrishnan *et al.*, 2010; Nayak, 2010; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014).

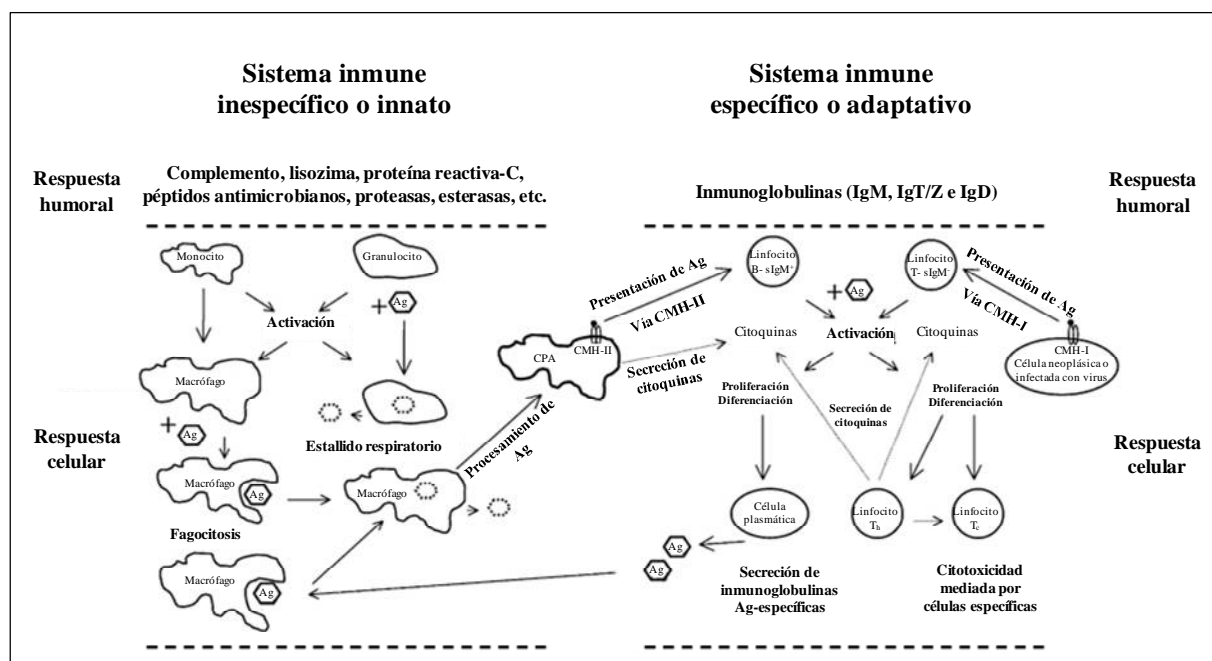


Figura 2.6. Esquema del funcionamiento del sistema inmune de los peces teleósteos. Abreviaturas: Ag, antígeno; CPA, célula presentadora de antígeno; CMH, complejo mayor de histocompatibilidad; sIgM, inmunoglobulina M de superficie; Linfocito T_h , linfocito auxiliar o *helper*; Linfocito T_c , linfocito citotóxico. Adaptado de Köllner *et al.* (2002).

II.3.3.3.1. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas producidas por las células del sistema inmune que contribuyen a los mecanismos de crecimiento, diferenciación y defensa celular en el hospedador (Nayak, 2010). Algunos estudios en peces han puesto de manifiesto que algunos probióticos (*Lb. rhamnosus*, *E. faecium*, *B. subtilis*, *Lb. delbrueckii* y *Lb. plantarum*) modulan la producción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , IL-8, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y γ -interferón (IFN- γ) y/o citoquinas anti-inflamatorias como la interleuquina-10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante- β (TFG- β) en trucha arcoíris (Kim y Austin, 2006b; Panigrahi *et al.*, 2007; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b) y lubina (Picchietti *et al.*, 2009).

II.3.3.3.2. Actividad fagocítica

La actividad fagocítica de los leucocitos (monocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos) es responsable de la activación temprana de la respuesta inflamatoria que se origina antes de la producción de anticuerpos y que desempeña un papel importante como defensa innata frente a los patógenos en peces (Li *et al.*, 2006; Nayak, 2010). Se ha demostrado en varios estudios que algunas bacterias probióticas (*Lb. rhamnosus*, *Lb. sakei*, *E. faecium*, *Lb. curvatus* subesp. *curvatus*, *L. lactis* subesp. *cremoris*, *L. lactis* subesp. *lactis*, *Lc. mesenteroides* subesp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella cibaria*, *V. fluvialis*, *A. hydrophila*, *Carnobacterium* spp., *Cl. butyricum*, *A. sobria*, *Bacillus* spp., *Shewanella putrefaciens* y *Shewanella baltica*) aumentan la actividad fagocítica en leucocitos de tilapia (Pirarat *et al.*, 2011), trucha arcoíris (Irianto y Austin, 2003; Brunt *et al.*, 2007; Balcázar *et al.*, 2007a) y dorada (Díaz-Rosales *et al.*, 2006).

II.3.3.3.3. Estallido respiratorio

El estallido respiratorio es un mecanismo del sistema inmune innato por el que los leucocitos liberan especies reactivas de oxígeno (radicales superóxido y peróxido de oxígeno) con actividad bactericida (Köllner *et al.*, 2002; Nayak, 2010). Varios estudios han mostrado que algunos probióticos (*B. subtilis*, *B. coagulans*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. delbrueckii*, *E. faecium*, *Lb. curvatus* subesp. *curvatus*, *L. lactis* subesp. *cremoris*, *L. lactis* subesp. *lactis*, *Lc. mesenteroides* subesp. *cremoris*, *P. pentosaceus*, *W. cibaria* y Vibrionáceas) incrementan el estallido respiratorio en leucocitos de tilapia (Zhou *et al.*, 2010), trucha arcoíris (Nikoskelainen *et al.*, 2003), dorada (Salinas *et al.*, 2006).

II.3.3.3.4. Actividad peroxidasa

La peroxidasa es una enzima liberada por los gránulos azurófilos de los neutrófilos durante el estallido respiratorio y que utiliza los radicales oxidativos para producir ácido hipocloroso, el cual ejerce actividad antimicrobiana (Nayak, 2010). En algunos estudios se ha observado que la administración de algunos probióticos (*B. subtilis*, *Lb. delbrueckii* subesp. *lactis* y *E. faecium*) aumenta la actividad peroxidasa de los neutrófilos en dorada (Salinas *et al.*, 2008a) y tilapia (Wang *et al.*, 2008a).

II.3.3.3.5. Lisozima

La lisozima es una de las enzimas bactericidas más importantes de la inmunidad innata de los peces (Lindsay, 1986). Varios estudios han puesto de manifiesto que algunos probióticos (*Lb. rhamnosus*, *Lb. sakei*, *L. lactis* subesp. *lactis*, *Lc. mesenteroides*, *C. maltaromaticum*, *C. divergens*)

aumentan los niveles de lisozima en suero de trucha arcoíris (Panigrahi *et al.*, 2004; Kim y Austin, 2006b) y trucha común (*Salmo trutta*) (Balcázar *et al.*, 2007b). Por otra parte, Taoka *et al.* (2006b) observaron un incremento de la lisozima en la mucosa de la piel de tilapia administrando un cultivo probiótico mixto comercial (*Lb. acidophilus*, *B. subtilis*, *Cl. butyricum* y *Sc. cerevisiae*).

II.3.3.3.6. Actividad del complemento

El sistema del complemento juega un papel importante en la respuesta inmune innata humoral de los peces, ya que interviene en la quimiotaxis, opsonización, fagocitosis y degradación de patógenos (Nayak, 2010). Varios estudios han puesto de manifiesto que algunos probióticos (*E. faecium*, *B. subtilis*, *Lb. delbrueckii* subesp. *lactis*) mejoran la actividad del complemento en trucha arcoíris (Panigrahi *et al.*, 2007) y dorada (Salinas *et al.*, 2008a).

II.3.3.3.7. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas que constituyen parte de la defensa humoral específica del sistema inmune de los peces, cuya función principal es identificar y neutralizar los elementos extraños al hospedador (Ellis, 1999). Hasta la fecha se han descrito tres isotipos de Ig en peces teleósteos: IgM, IgT/IgZ e IgD. La IgM se describió hace varias décadas y es la principal Ig en el plasma de los peces teleósteos con un papel fundamental en la respuesta inmune sistémica. También se ha descrito que esta Ig tiene función en las mucosas (piel, intestino y agallas) frente a varios patógenos aunque su concentración en esta localización es menor que a nivel sistémico (Gómez *et al.*, 2013). La IgT o también denominada IgZ se describió en 2005 en la trucha arcoíris (Hansen *et al.*, 2005) y en el pez cebra (*Danio rerio*) (Danilova *et al.*, 2005), respectivamente, siendo el único isotipo de Ig en teleósteos con función especializada a nivel de las mucosas y considerada similar a la IgA de los mamíferos. Por último, la IgD se descubrió en 1997 (Wilson *et al.*, 1997) en la trucha arcoíris y a pesar de que se expresa en todos los tejidos inmunes, su concentración en plasma es muy baja y su función todavía no está esclarecida (Gómez *et al.*, 2013). Varios estudios han demostrado que la administración de probióticos en peces puede estimular la producción de inmunoglobulinas. Song *et al.* (2006) observaron altos niveles de inmunoglobulinas (IgM) en el suero y el mucus de la piel de corvina (*Miichthys miiuy*) tras la administración de *Cl. butyricum* en la dieta. Asimismo, Nikoskelainen *et al.* (2003) y Panigrahi *et al.* (2005) mostraron en distintos estudios que dos cepas de *Lb. rhamnosus* (ATCC53103 y JCM1136, respectivamente) aumentan los niveles de Ig totales en la trucha arcoíris.

II.3.3.4. Mejora de la calidad del agua de cultivo

La mejora de la calidad del agua de cultivo de peces y crustáceos ha sido asociada especialmente a bacterias Gram-positivas del género *Bacillus* spp. debido a su eficiencia en la degradación de materia orgánica a dióxido de carbono (Verschuere *et al.*, 2000b; Balcázar *et al.*, 2006; Martínez Cruz *et al.*, 2012). Dalmi *et al.* (2001) observaron que el empleo de *Bacillus* spp. mejoraba la calidad del agua y las tasas de supervivencia y crecimiento en juveniles de langostinos jumbo, reduciendo también la proliferación de vibrios. Resultados parecidos fueron obtenidos por Taoka *et al.* (2006b), quienes observaron que el empleo de una mezcla de bacterias y levaduras (*B. subtilis*, *Lb. acidophilus*, *Cl. butyricum* y *S. cerevisiae*) mejoraba la calidad del agua y la tasa de supervivencia del falso halibut del Japón. Asimismo, Wang *et al.* (2005) mostraron que un probiótico comercial compuesto por *Bacillus* spp., *S. cerevisiae*, *Nitrosomonas* spp. y *Nitrobacter* spp. reducía la concentración de nitrógeno inorgánico y fosfato del agua de cultivo del camarón blanco del Pacífico.

II.3.3.5. Mejora de la reproducción

El empleo de probióticos para mejorar la reproducción en peces sólo se ha estudiado hasta la fecha en especies ornamentales. El primer estudio sobre el efecto de probióticos en el desarrollo reproductivo fue realizado por Ghosh *et al.* (2008) empleando una cepa de *B. subtilis* en cuatro especies distintas de peces ornamentales (*Poecilia reticulata*, *Poecilia sphenops*, *Xiphophorus helleri* y *Xiphophorus maculatus*). Los resultados mostraron que este probiótico incrementó el índice gonadosomático, la fecundidad, la viabilidad y la producción de alevines en las cuatro especies de peces estudiadas. Además, estos autores propusieron que las vitaminas B1 (tiamina) y B12 (cobalamina) sintetizadas por este probiótico contribuían a reducir el número de alevines muertos o con deformidades. Por otra parte, Abasali y Mohamad (2010) llevaron a cabo un estudio similar en *X. helleri* con un producto comercial que incluía *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *E. faecium* y *Bifidobacterium thermophilum*, observando una mayor producción de alevines por hembra y una mayor fecundidad.

II.3.3.6. Tolerancia al estrés

Uno de los primeros estudios sobre el efecto de los probióticos en la tolerancia al estrés de peces de cultivo fue realizado por Carnevali *et al.* (2006) en lubina, en el que observaron un descenso de la hormona cortisol en los peces alimentados con *Lb. delbrueckii* subesp. *delbrueckii*. Por otra parte, Taoka *et al.* (2006a) detectaron que un grupo de falsos halibuts del Japón sometidos a choques térmicos y tratados con probióticos (*B. subtilis*, *Lb. acidophilus*, *Cl. butyricum* y *S. cerevisiae*) mostró un mayor tiempo letal (LT₅₀) y, por lo tanto, una mejor tolerancia al estrés térmico que el grupo control. Otra forma de valorar el estrés en peces es cuantificar los niveles de glucosa y lactato en el

plasma, ya que estos parámetros aumentan como respuesta secundaria durante períodos de estrés y altos requerimientos energéticos. En ese sentido, Valera *et al.* (2010) observaron que las reservas de glicógeno y triglicéridos en los hígados de doradas alimentadas con *Alteromonas* spp. fue mayor que en el grupo control. Asimismo, Castex *et al.* (2010) observaron una disminución de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa en el grupo de camarones azules (*Litopenaeus stylirostris*) tratados con el probiótico *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5 con respecto al grupo control.

II.3.4. FACTORES QUE AFECTAN A LA EFECTIVIDAD DE LOS PROBIÓTICOS

II.3.4.1. Origen: microorganismos endógenos vs. exógenos

La administración de microorganismos probióticos aislados de la misma especie acuícola en la que se pretenden utilizar se considera, de forma general, que presenta mayores ventajas para resistir a las condiciones del tracto gastrointestinal, colonizar, establecerse y multiplicarse en el intestino del hospedador y, de esta forma, competir frente a los patógenos (Verschuere *et al.*, 2000b; Farzanfar, 2006; Vine *et al.*, 2006; Balcázar *et al.*, 2007a; Nayak, 2010; Merrifield *et al.*, 2010b; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b). Sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto la eficacia del empleo en acuicultura de probióticos comerciales utilizados en el hombre y animales (Nikoskelainen *et al.*, 2001b; Nikoskelainen *et al.*, 2003; Panigrahi *et al.*, 2007; Castex *et al.*, 2008; Ferguson *et al.*, 2010) (sección II.4.4.). De la misma forma, el empleo de bacterias probióticas aisladas de especies de peces distintas al hospedador en el que se pretenden emplear también ha mostrado ser beneficioso. Así, Díaz-Rosales *et al.* (2009) demostraron que las cepas *Sh. putrefaciens* Pdp11 y *Sh. baltica* Pdp13, aisladas de piel de dorada, mejoraron las tasas de crecimiento del lenguado senegalés después de su administración en la dieta durante 60 días, así como su supervivencia tras la inoculación del patógeno *Ph. damsela* subesp. *piscicida*. De forma similar, Sorroza *et al.* (2012) observaron que la administración de *Vagococcus fluvialis*, aislada de intestino de dorada, mejoraba la tasa de supervivencia de lubinas infectadas con *Ls. anguillarum* 975-1.

II.3.4.2. Viabilidad: formas viables vs. inactivadas

Los probióticos, por definición, son microorganismos viables que ejercen un efecto beneficioso en el hospedador (Fuller, 1989; FAO, 2002). De acuerdo con esta definición, la viabilidad es un requerimiento esencial en un microorganismo probiótico, ya que permite la adhesión a y la colonización de las superficies mucosas y el desplazamiento e inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos mediante la producción de sustancias antimicrobianas y competencia por los nutrientes y sitios de adhesión (sección II.3.3.1.). Sin embargo, ciertos microorganismos en su forma inactivada han mostrado tener un efecto beneficioso en el hospedador (Nayak, 2010). A este

respecto, diversos estudios han demostrado la capacidad inmunoestimuladora de probióticos inactivados en peces empleando ensayos *in vitro* (Salinas *et al.*, 2006; Román *et al.*, 2012) e *in vivo* (Díaz-Rosales *et al.*, 2006), así como el control de enfermedades (Irianto y Austin, 2003). Esta capacidad inmunoestimulante de las formas no viables puede atribuirse a la presencia de componentes (polisacáridos, peptidoglicano y ácido lipoteicoico) que pueden estimular el sistema inmune de los peces (Nayak, 2010). A pesar de estos estudios, otros autores han demostrado que los microorganismos en sus formas viables poseen mejor capacidad para estimular el sistema inmune de los peces en comparación con sus formas inactivadas (Panigrahi *et al.*, 2005; Galdeano y Perdigon, 2006; Taoka *et al.*, 2006b).

II.3.4.3. Monocultivo (monocepa) vs. cultivo mixto (multicepas/multiespecies)

En los últimos años, un gran número de estudios han confirmado los efectos beneficiosos de las preparaciones con una única cepa probiótica (cultivo monocepa) (Nayak, 2010). Sin embargo, varios estudios han puesto de manifiesto que el empleo de preparaciones con varias cepas probióticas de la misma especie o de especies diferentes (cultivos multicepas/multiespecies) también presenta capacidad inmunoestimuladora en peces (Aly *et al.*, 2008; Salinas *et al.*, 2008a). A este respecto, Aly *et al.* (2008) observaron que la administración conjunta de *B. subtilis* y *Lb. acidophilus* mejoraba la supervivencia de tilapia tras la infección con varios ictiopatógenos en comparación con el efecto de las mismas cepas empleadas independientemente. Asimismo, Salinas *et al.* (2008a) observaron que la administración conjunta de *B. subtilis* y *Lb. delbrueckii* subesp. *lactis* en su forma inactivada aumentaban los niveles de IgM⁺ y de la actividad del complemento en el suero de juveniles de doradas, mientras que la administración individual de cada estas cepas no produjo ningún cambio. Sin embargo, Choi y Yoon (2008) observaron que la administración conjunta de dos cepas inactivadas del género *Shewanella* (Pdp11 y 51M6) no presentaba ningún efecto inmunoestimulante adicional en la trucha comparado con la administración de las cepas de forma individual.

II.3.4.4. Dosis de probiótico y duración de su administración

La dosis y duración de la administración de probióticos son dos factores muy importantes que no sólo afectan al establecimiento y persistencia del probiótico en las superficies mucosas, sino también a los efectos beneficiosos que pueden proporcionar al hospedador, incluyendo la estimulación de la respuesta inmune (Nayak, 2010). En general, la dosis de probióticos se suele seleccionar con base en su habilidad para mejorar el crecimiento, proteger al hospedador y estimular el sistema inmune. Brunt *et al.* (2007) determinaron que la dosis efectiva de *Bacillus* spp. JB-1 para obtener el menor porcentaje de mortalidad de la trucha después de la infección con varios patógenos era de 2×10^8 ufc/g. Otros estudios *in vitro* (Salinas *et al.*, 2006) e *in vivo* (Kumar *et al.*, 2008) también indican que la respuesta inmune de

los peces varía según la concentración de probióticos. En acuicultura, las dosis empleadas suelen estar comprendidas entre 10^6 – 10^{10} ufc/g, siendo necesario determinar la dosis óptima para cada hospedador.

Por otra parte, la duración de la administración de probióticos en la dieta de peces que ha mostrado efectos en el hospedador está comprendida entre 1 y 10 semanas, aunque el tiempo óptimo para observar los efectos beneficiosos en el hospedador depende de cada cepa (Nayak, 2010). Sharifuzzaman y Austin (2009) observaron una mayor estimulación de la inmunidad y protección frente a *Ls. anguillarum* en la trucha arcoíris en la segunda semana de suplementación con *Kocuria* spp. SM1 que en la tercera y cuarta semanas. Sin embargo, Díaz-Rosales *et al.* (2009) observaron que la administración de *Shewanella* sp. Pdp11 durante 60 días en el cultivo del lenguado senegalés aumentaba significativamente el estallido respiratorio de los leucocitos aislados de riñón anterior en comparación con su administración durante 30 días.

II.3.4.5. Modos de administración

El modo más común para la administración de probióticos en acuicultura es mediante su incorporación a los piensos. Sin embargo, existen otras formas de administración tales como adición al agua de cultivo, baño y bioencapsulación en el alimento vivo (artemias y rotíferos), siendo todos estos métodos los más utilizados en larvicultura debido a que se emplea un menor volumen de agua de cultivo (Verschuere *et al.*, 2000b; Vine *et al.*, 2006).

II.3.4.5.1. Bioencapsulación: artemias y rotíferos

Los sistemas intensivos empleados en la acuicultura marina para producir grandes cantidades de larvas de peces y crustáceos (larvicultura) son afectados frecuentemente por bacterias patógenas, dando lugar a altas tasas de mortalidad y originando grandes pérdidas económicas (Sorgeloos *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2006a). A este respecto, las artemias (*Artemia franciscana* y *Artemia salina*) y los rotíferos (*Brachionus plicatilis*) son considerados como las principales presas vivas empleadas para el cultivo de larvas de muchas especies acuáticas (Lavens y Sorgeloos, 2000; Dhert *et al.*, 2001). Sin embargo, varios autores han observado que estos organismos pueden transferir bacterias patógenas a las larvas, originando altos porcentajes de mortalidad durante esta etapa (Verschuere *et al.*, 1997; Dhert *et al.*, 2001; Olafsen, 2001; Vaseeharan y Ramasamy, 2003). A este respecto, la vibriosis, originada por varias especies del género *Vibrio* spp., es considerada como la enfermedad más importante durante la etapa larvaria (Gómez-Gil *et al.*, 2004) (sección II.2.4.1.1). Una forma de administrar los probióticos en cultivos larvarios es mediante su bioencapsulación en *Artemia* spp. y *Br. plicatilis* ya que son organismos filtradores no selectivos. El enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* spp. y de rotíferos con microalgas marinas, micropartículas y emulsiones ha sido empleado para mejorar su valor nutricional y aportar un mayor nivel de nutrientes a las larvas cultivadas (Léger *et al.*, 1987; Dhert *et*

al., 2001). El enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* spp. y de los rotíferos por medio de la bioencapsulación consiste en la incubación de los mismos en una suspensión o emulsión de enriquecimiento (Léger *et al.*, 1987; Dhert *et al.*, 2001). De la misma forma, los microorganismos probióticos se pueden bioencapsular en artemias y rotíferos para su posterior administración a las larvas de peces y crustáceos (Carnevali *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2006c). A este respecto, *Artemia* spp. también se ha empleado como modelo animal para el estudio del modo de acción de probióticos debido a que se puede cultivar en condiciones gnotobióticas (axénicas) y utilizar como vector de probióticos en la especie diana (Marques *et al.*, 2006a). Varias cepas de la especie *A. hydrophila* y diversas especies de los géneros *Vibrio*, *Moraxella*, *Kurthia*, *Cytophaga*, *Microbacterium* y *Exiguobacterium*, junto a levaduras, se han propuesto como probióticos con base en los resultados en la supervivencia y crecimiento de *A. franciscana* en presencia y ausencia de ictiopatógenos (*V. campbellii*, *V. proteolyticus* y *V. parahaemolyticus*) empleando cultivos gnotobióticos (Verschuere *et al.*, 1999; 2000a; Orozco-Medina *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2005; 2006b). Asimismo, se ha descrito la eficacia de bacterias lácticas en cultivos de *Artemia* sp. para inhibir al ictiopatógeno *V. alginolyticus* (Villamil *et al.*, 2003; Lamari *et al.*, 2014) y del empleo de probióticos en la mejora del crecimiento e inhibición de microorganismos patógenos en cultivos de rotíferos (Harzevili *et al.*, 1998; Planas *et al.*, 2004; Murillo y Villamil, 2011). Harzevili *et al.* (1998) observaron que *Lactococcus lactis* AR21 sólo mejoraba el crecimiento de los rotíferos en presencia de *Ls. anguillarum* cuando se cultivaban en condiciones subóptimas de alimentación. Planas *et al.* (2004) observaron que la adición de *Lactococcus casei* subesp. *casei* Lb3.04, *P. acidilactici* Pc1.02 o *Lactobacillus lactis* subesp. *lactis* Lc1.04 junto con *Sc. cerevisiae* aumentaba el crecimiento de los rotíferos e incrementaba su densidad. Murillo y Villamil (2011) demostraron que la adición de *B. subtilis* CCBM-64 incrementaba la densidad de rotíferos y reducía los recuentos de *V. alginolyticus*. Asimismo, otros estudios han observado que la bioencapsulación de varias especies de bacterias lácticas en rotíferos mejoraba la supervivencia del rodaballo y le protegía frente a *Vibrio* sp. (Gatesoupe, 1991, 1994). Por otra parte, Carnevali *et al.* (2004) observaron que la administración de *Lactobacillus fructivorans* AS17B y *Lb. plantarum* 906 mediante su bioencapsulación en *A. salina* y *Br. plicatilis* mejoraba la supervivencia de larvas de dorada.

II.3.4.5.2. Adición al agua de cultivo y baño

Los probióticos en acuicultura también se pueden adicionar directamente al agua de cultivo de los peces o mediante su baño en suspensiones bacterianas durante un tiempo determinado (Verschuere *et al.*, 2000b). A este respecto, varios estudios han demostrado la eficacia de varios probióticos empleando estas formas de administración (Austin *et al.*, 1995; Spanggaard *et al.*, 2001; Makridis *et al.*, 2005; Fjellheim *et al.*, 2010). Austin *et al.* (1995) observaron que el baño con *V. alginolyticus* (10^8 ufc/ml) durante 10 minutos mejoraba la supervivencia del salmón Atlántico frente a *A. salmonicida*, *Ls.*

anguillarum y *V. ordalii* (10^7 ufc/ml). Spanggaard *et al.* (2001) demostraron que la administración de distintas especies del género *Pseudomonas* por baño (10^7 ufc/ml; 1 h) y después por adición al agua de cultivo (10^5 ufc/ml) protegía a la trucha arcoíris frente a *Ls. anguillarum* 90-11-287 (10^4 – 10^5 ufc/ml). Makridis *et al.* (2005) observaron que varias bacterias pertenecientes a varias especies (*Cytophaga* sp., *Roseobacter* sp., *Ruegeria* sp., *Paracoccus* sp., *Aeromonas* sp. y *Shewanella* sp.) administradas al agua de cultivo (10^5 – 10^6 ufc/ml) mejoraban la supervivencia de larvas de dorada. Finalmente, Fjelheim *et al.* (2010) demostraron que la adición de bacterias de distintas especies (*Vibrio* sp., *Microbacterium* sp., *Ruegeria* sp. *Pseudoalteromonas* sp.) (10^4 y 10^7 ufc/ml) al agua de cultivo del bacalao del Atlántico mejoraba la supervivencia de sus larvas.

II.3.5. PRINCIPALES GRUPOS MICROBIANOS EVALUADOS COMO PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA

Históricamente, los probióticos se han asociado a la ganadería y la medicina humana, limitándose su empleo a bacterias Gram-positivas, concretamente bacterias lácticas y *Bifidobacterium* spp.; sin embargo, desde hace unos años se ha propuesto la utilización de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras y algas unicelulares como probióticos en la acuicultura continental y marina (Tabla II.5) (Verschuere *et al.*, 2000b; Martínez Cruz *et al.*, 2012; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014).

II.3.5.1. Bacterias Gram-positivas

La mayoría de las bacterias Gram-positivas propuestas como probióticos para su empleo en acuicultura pertenecen al grupo de las bacterias lácticas (sección II.4) y al género *Bacillus* (Balcázar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008b). El género *Bacillus* constituye un grupo diverso de bacterias con forma de bastón que se caracterizan por producir endosporas en respuesta a condiciones medioambientales adversas. La mayoría de las especies de este género no son consideradas perjudiciales para el hombre o los animales y tienen un gran interés comercial como productores de antibióticos y enzimas (Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). La principal especie que se ha evaluado como probiótico en acuicultura es *B. subtilis*. Kennedy *et al.* (1998) observaron que la administración de una cepa de *B. subtilis* al agua de cultivo del róbalo común (*Centropomus undecimalis*) reducía la proliferación de *Vibrio* spp. Resultados similares fueron observados en tanques de camarones en los que se administraron *Bacillus* spp., reduciéndose también la tasa de mortalidad de los peces por vibriosis (Moriarty, 1998). El empleo de *B. subtilis* redujo la mortalidad de camarones blancos del Pacífico infectados con *V. parahaemolyticus* (Balcázar *et al.*, 2007c) y mejoró el crecimiento y estimuló la respuesta inmune innata en el mero de pintas naranjas (*Epinephelus coioides*) (Liu *et al.*, 2012). Esta especie bacteriana también mostró efectos beneficiosos en juveniles de pepinos de mar (*Apostichopus japonicus*) tras la

infección con *V. splendidus* (Zhao *et al.*, 2012). Además, varias cepas de *Bacillus* spp. se han utilizado para mejorar la calidad del agua en acuicultura, aprovechando su capacidad de degradar nitritos en condiciones aeróbicas (Song *et al.*, 2011).

II.3.5.2. Bacterias Gram-negativas

Las principales bacterias Gram-negativas propuestas como probióticos en acuicultura incluyen especies de los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Roseobacter* y *Vibrio* (Nayak, 2010; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). Riquelme *et al.* (1996) observaron una mejoría de la tasa de supervivencia de larvas de vieira (*Pecten maximus*) tratadas con *Alteromonas haloplanktis* e infectadas con *Ls. anguillarum*. Gibson *et al.* (1998) también demostraron que *Aeromonas media* reducía la proliferación de *Vibrio tubiashii* en larvas de ostras japonesas (*Crassostrea gigas*). De forma similar, Ruiz- Ponte *et al.* (1999) observaron que *Roseobacter* spp. en cocultivo con *Ls. anguillarum* poseía un efecto inhibitor sobre este ictiopatógeno, mejorando la supervivencia de las larvas de vieira. Gram *et al.* (1999) observaron que *Ps. fluorescens* reducía la mortalidad de truchas arcoíris infectadas con *Ls. anguillarum*. Irianto y Austin (2002) observaron que *A. hydrophila* y *V. fluvialis* fueron efectivas controlando la infección de *A. salmonicida* en trucha arcoíris. Balcázar *et al.* (2007c) observaron que la administración de *V. alginolyticus* UTM 102, *Roseobacter gallaeciensis* SLV03 y *Ps. aestumarina* SLV22 en cultivos de camarón blanco del Pacífico protegía frente al patógeno *V. parahaemolyticus*. Giri *et al.* (2012) observaron que la administración de *Ps. aeruginosa* VSG-2 en cultivos de labeo roho (*Labeo rohita*) protegía a los peces frente a la infección de *A. hydrophila*.

A pesar de que estos estudios demuestran que bacterias Gram-negativas pertenecientes a especies patógenas (*V. alginolyticus*, *A. hydrophila* y *Ps. aeruginosa*) o a géneros que incluyen especies patógenas (*Pseudomonas*, *Vibrio* o *Aeromonas*) protegen a los peces de otros ictiopatógenos, se debería evaluar su seguridad, incluyendo la presencia de genes de resistencia a antibióticos y/o factores de virulencia, para así asegurar la administración de cepas probióticas seguras para el hombre y los animales.

Tabla II.5. Estudios realizados sobre el empleo de microorganismos como probióticos en acuicultura continental y marina.

Especie hospedadora	Probiótico	Tipo de ensayo	Método de administración (in vivo)	Propiedad probiótica (in vitro) y/o efecto en el hospedador (in vivo)	Referencia
Acuicultura continental					
Peces					
Esturión beluga (<i>Huso huso</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Ellipsoideus</i> (inactivado)	In vivo	Adición a la dieta	Mejora del crecimiento y modulación de la microbiota intestinal	Hoseiniyar <i>et al.</i> (2011)
Peca de río (<i>Perca fluviatilis</i>)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> JF3835	In vivo	Adición a la dieta	Colonización intestinal y protección frente a <i>Aeromonas sobria</i>	Gobeli <i>et al.</i> (2009)
Roho labeo (<i>Labeo rohita</i>)	<i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	In vivo	Adición a la dieta	Mejora de la digestibilidad de la dieta suplementada con guaje (<i>Leucaena leucocephala</i>)	Bairagi <i>et al.</i> (2004)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VSG-2	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune y protección frente a <i>Aeromonas hydrophila</i>	Giri <i>et al.</i> (2012)
Salmon atlántico (<i>Salmo salar</i>)	<i>Lactobacillus plantarum</i> VSG3	In vivo	Adición a la dieta	Mejora del crecimiento, estimulación del sistema inmune y protección frente a <i>A. hydrophila</i>	Giri <i>et al.</i> (2013)
	<i>Terraeischnis suecica</i>	In vitro e in vivo	Adición a la dieta	Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes y extractos frente a <i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Listonella anguillarum</i> , <i>Vibrio salmonicida</i> y <i>Yersinia ruckeri</i> . Protección frente a estos ktiopatógenos	Austin <i>et al.</i> (1992)
	<i>Vibrio alginolyticus</i>	In vivo	Baño en suspensión bacteriana	Protección frente a <i>A. salmonicida</i> , <i>Ls. anguillarum</i> y <i>Vibrio ordalii</i>	Austin <i>et al.</i> (1995)
Surubí híbrido (<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> y <i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>)	<i>Carnobacterium</i> sp. K1	In vitro e in vivo	Adición a la dieta	Actividad antimicrobiana frente a <i>A. hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>Flavobacterium psychrophilum</i> , <i>Photobacterium damela</i> subsp. <i>placidula</i> , <i>Streptococcus milleri</i> , <i>Ls. anguillarum</i> y <i>V. ordalii</i> . Protección frente a <i>V. ordalii</i> y <i>Y. ruckeri</i>	Robertson <i>et al.</i> (2000)
	<i>Weissella cibaria</i>	In vivo	Adición a la dieta	Reducción de <i>Vibrio</i> spp. en intestino y aumento de Ig en suero	Mouriño <i>et al.</i> (2012)
Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	<i>Pediacoccus acidilactici</i> CNCM MA 185 M	In vivo	Adición a la dieta	Modulación de la microbiota intestinal y estimulación del sistema inmune in nato	Ferguson <i>et al.</i> (2010)
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Bacillus</i> sp. C5118	In vivo	Adición a la dieta	Inhibición de <i>Aeromonas</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> spp. en el intestino	Del'Duca <i>et al.</i> (2013)
	<i>Sc. cerevisiae</i>	In vivo	Adición a la dieta	Protección frente a vibriosis	Lara-Flores <i>et al.</i> (2003)
	<i>Carnobacterium</i> sp. K1	In vitro e in vivo	Adición a la dieta	Inhibición de <i>Ls. anguillarum</i> y <i>A. salmonicida</i> en el mucus de intestino. Ausencia de patogenicidad in vivo	Jebom <i>et al.</i> (1997)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	In vivo	Adición al agua de cultivo	Mejora de la supervivencia tras la infección con <i>Ls. anguillarum</i>	Gram <i>et al.</i> (1999)
	<i>Carnobacterium</i> sp. K1	In vivo	Adición a la dieta	Protección frente a <i>A. salmonicida</i> y <i>Y. ruckeri</i>	Robertson <i>et al.</i> (2000)
	<i>Pseudomonas libanensis</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Ps. fluorescens</i>	In vitro e in vivo	Baño en suspensión bacteriana y adición al agua de cultivo	Actividad antimicrobiana frente a <i>Ls. anguillarum</i> . Protección frente a este ktiopatógeno	Spanggaard <i>et al.</i> (2001)
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC53103, <i>Lactobacillus casei</i> Shirota, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC11842, <i>Lb. rhamnosus</i> LC705, <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12, <i>Lactobacillus johnsonii</i> La1, <i>Enterococcus faecium</i> Tehobak	In vitro	-	Adhesión al mucus de branquias, piel, esófago, estómago e intestino de trucha, inhibición de la adhesión de <i>A. hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>Y. ruckeri</i> y/o <i>L. anguillarum</i> al mucus de intestino de trucha, penetración en mucus intestinal, inhibición de <i>A. salmonicida</i> y/o <i>Ls. anguillarum</i> en coacervo y/o supervivencia en bilis de trucha	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2001)
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC53103	In vivo	Adición a la dieta	Protección frente a <i>A. salmonicida</i>	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2001)
	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC53103	In vivo	Adición a la dieta	Mejora de la respuesta inmune	Nikoskelainen <i>et al.</i> (2003)
	<i>Vibrio fluvialis</i> A3-47S, <i>A. hydrophila</i> A3-51, <i>Carnobacterium</i> sp. BA211, <i>Micrococcus luteus</i> A1-6	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune y protección frente a <i>A. salmonicida</i>	Inamoto y Austin (2002)
	<i>Lb. rhamnosus</i> JCM 1136	In vivo	Adición a la dieta	Mejora de la respuesta inmune	Panigrahi <i>et al.</i> (2004)
	<i>Lb. rhamnosus</i> JCM 1136	In vivo	Adición a la dieta	Mejora de la respuesta inmune con el probiótico viable con respecto a su forma inactivada	Panigrahi <i>et al.</i> (2005)

Tabla II.5. Continuación.

Especie hospedadora	Probiótico	Tipo de ensayo	Método de administración (in vivo)	Propiedad probiótica (in vitro) y/o efecto en el hospedador (in vivo)	Referencia
Acuicultura continental					
Peces					
Turca arcoiris (<i>O. mykiss</i>)					
	<i>P. acidilactici</i> CNCM MA 18/5M	In vivo	Adición a la dieta	Mejora del síndrome de compresión de la columna vertebral	Aubin <i>et al.</i> (2005)
	<i>A. sobria</i> GC2	In vivo	Adición a la dieta	Protección frente a <i>Lactococcus garvieae</i> 29-99 y <i>Streptococcus iniae</i> 00-318 y mejora de la respuesta inmune	Brunt y Austin (2005)
	<i>Lactobacillus sakei</i> CLFP202, <i>Lactococcus lactis</i> CLFP100, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> CLFP196	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune y protección frente a <i>A. salmonicida</i>	Balcázar <i>et al.</i> (2007)
	<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC53103, <i>B. subtilis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune y expresión de citoquinas	Panigrahi <i>et al.</i> (2007)
	<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP238, <i>Lc. mesenteroides</i> CLFP196	In vivo	Adición a la dieta	Exclusión competitiva y protección frente a <i>L. garvieae</i>	Vendrell <i>et al.</i> (2008)
	<i>L. lactis</i> CLFP101, <i>Lb. plantarum</i> CLFP238, <i>Lactobacillus fermentum</i> CLFP242	In vitro	-	Inhibición de la adhesión de <i>A. hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>Y. ruckeri</i> y/o <i>Ls. anguillarum</i> al mucus de intestino de trucha y supervivencia a pH bajo y bilis de trucha	Balcázar <i>et al.</i> (2008)
	<i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>E. faecium</i>	In vivo	Adición a la dieta	Mejora del índice de conversión y modulación de la microbiota intestinal	Merrifield <i>et al.</i> (2010a)
	<i>Kocuria</i> sp. SM1	In vivo	Adición a la dieta	Protección frente a <i>Ls. anguillarum</i>	Sharifuzzaman y Austin (2009)
	<i>Lb. rhamnosus</i> JCM1136	In vivo	Adición a la dieta	Modificación en parámetros sanguíneos	Panigrahi <i>et al.</i> (2010)
	<i>A. sobria</i> GC2, <i>B. subtilis</i> JB-1 (componentes celulares)	In vivo	Inyección intramuscular e intraperitoneal	Protección frente a <i>Y. ruckeri</i>	Abbass <i>et al.</i> (2010)
	<i>Enterobacter</i> sp. CG-6, <i>Enterobacter</i> sp. CG-8	In vivo	Adición a la dieta	Protección frente a <i>F. psychrophilum</i>	Burbank <i>et al.</i> (2011)
	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> CLFP3, <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremonis</i> CLFP25, <i>Lc. mesenteroides</i> CLFP68	In vitro	-	Actividad antimicrobiana frente a <i>L. garvieae</i> , capacidad de adhesión por hidrofobicidad y/o supervivencia a pH bajo y bilis de trucha	Pérez-Sánchez <i>et al.</i> (2011a)
	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> CLFP3, <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremonis</i> CLFP25, <i>Lc. mesenteroides</i> CLFP68	In vivo	Adición a la dieta	Expresión de citoquinas y protección frente a <i>L. garvieae</i>	Pérez-Sánchez <i>et al.</i> (2011b)
	<i>Pseudomonas</i> sp. MSB1	In vitro	-	Actividad antimicrobiana frente a <i>F. psychrophilum</i>	Sjöström-Bestor y Wiklund (2011)
	<i>Sc. cerevisiae</i>	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune, mejor del crecimiento y protección frente a <i>Y. ruckeri</i>	Tokmechi <i>et al.</i> (2011)
	<i>Sc. cerevisiae</i>	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune y mejora del crecimiento	Sheikzadeh <i>et al.</i> (2012)
	<i>L. lactis</i> CLFP100, <i>Lc. mesenteroides</i> CLFP196	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune y protección frente a <i>A. salmonicida</i>	Balcázar <i>et al.</i> (2007)
Acuicultura marina					
Peces					
Abadejo (<i>Pollachius pollachius</i>)	<i>P. acidilactici</i> CNCM MA 18/5M	In vivo	Alimento vivo con <i>Artemia</i> sp.	Mejora en la ganancia de peso de larvas	Gatesoupe <i>et al.</i> (2002)
Anguila australiana (<i>Anguilla australis</i>)	<i>Aeromonas media</i> A199	In vivo	Adición al agua de cultivo	Reducción de la morbilidad de saprolegniosis (producida por <i>Saprolegnia parasitica</i>)	Latengen <i>et al.</i> (2004)
Anguila europea (<i>Anguilla anguilla</i>)	<i>E. faecium</i> SF68, <i>Bacillus toyoi</i>	In vivo	Adición a la dieta	Protección frente a <i>Edwardsiella tarda</i>	Chang y Lin (2002)
Bacalao atlántico (<i>Gadus morhua</i>)	<i>Carnobacterium divergens</i>	In vivo	Adición a la dieta	Protección frente a <i>Ls. anguillarum</i>	Gillberg <i>et al.</i> (1997)
	<i>Vibrio</i> sp., <i>Microbacterium</i> spp., <i>Ruegeria</i> sp., <i>Pseudalteromonas</i> sp.	In vitro e in vivo	Adición al agua de cultivo	Actividad antimicrobiana frente a <i>Ls. anguillarum</i> O2a y O2b, <i>Marinomonas</i> sp. y <i>Vibrio logei</i> , adhesión a mucus, producción de enzimas extracelulares, resistencia a la bilis y mejora de la supervivencia de larvas	Fjellheim <i>et al.</i> (2010)
Cabrilla sardina (<i>Myxopercera rosacea</i>)	<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS8339	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune y protección frente a <i>Amyloodinium ocellatum</i>	Reyes-Becerra <i>et al.</i> (2008)

Tabla II.5. Continuación.

Especie hospedadora	Probiótico	Tipo de ensayo	Método de administración (in vivo)	Propiedad probiótica (in vitro) y/o efecto en el hospedador (in vivo)	Referencia
Aquicultura marina					
Peces					
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	<i>Lactobacillus fructivorans</i> ASI7B, <i>Lb. plantarum</i> 906	In vivo	Alimento vivo con rotíferos (<i>Brachionus plicatilis</i>) y artemias (<i>Artemia salina</i>). Adición a la dieta	Mejora de la supervivencia de larvas y alevines	Camevali <i>et al.</i> (2004)
	<i>Cytophaga</i> sp., <i>Roseobacter</i> sp., <i>Ruergeria</i> sp., <i>Paracoccus</i> sp., <i>Aeromonas</i> sp., <i>Shewanella</i> sp.	In vivo	Adición al agua de cultivo	Mejora de la supervivencia de larvas	Makridis <i>et al.</i> (2005)
	<i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>lactis</i> CECT287 y <i>B. subtilis</i> CECT35	In vivo	Adición a la dieta	Modulación del sistema inmune innato	Salinas <i>et al.</i> (2005)
	<i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>lactis</i> CECT287, <i>B. subtilis</i> CECT35 y <i>Shewanella</i> 51M6 (inactivadas)	In vitro	-	Estimulación del sistema inmune innato	Salinas <i>et al.</i> (2006)
	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pp11, <i>Shewanella</i> sp. 51M6 (inactivadas)	In vivo	Adición a la dieta	Modulación del sistema inmune innato	Díaz-Rosales <i>et al.</i> (2006)
	<i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>lactis</i> CECT287, <i>B. subtilis</i> CECT35 (inactivadas)	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune (cultivo mixto)	Salinas <i>et al.</i> (2008)
Falso halibut del Japón (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	<i>Nannochloropsis gaditana</i> , <i>Tetraselmis chuii</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	In vivo	Adición a la dieta	Modulación del sistema inmune y expresión de genes de inmunidad	Cerezuola <i>et al.</i> (2012)
	<i>Vagococcus fluvialis</i> (formas viable e inactivada)	In vitro	-	Modulación del sistema inmune innato	Román <i>et al.</i> (2012)
	<i>B. subtilis</i> CECT35	In vivo	Adición a la dieta	Expresión de genes relacionados con la inflamación, desarrollo y digestión	Cerezuola <i>et al.</i> (2013)
	<i>Zooshikella</i> spp. JE-34	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune y protección frente a <i>Streptococcus iniae</i>	Kim <i>et al.</i> (2010)
	<i>Sh. putrefaciens</i> Pp11	In vitro e in vivo	Adición a la dieta	Adhesión a mucus de piel, actividad antimicrobiana e inhibición de la adhesión de <i>Vibrio harveyi</i> Lgl400 al mucus de piel e intestino. Protección frente a este ktiopatógeno	Chabrillón <i>et al.</i> (2005)
	<i>Porphyridium cruenum</i>	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del estallido respiratorio	Díaz-Rosales <i>et al.</i> (2008)
Labina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	<i>Sh. putrefaciens</i> Pp11, <i>Shewanella baltica</i> Pp13	In vivo	Adición a la dieta	Mejora del crecimiento y protección frente a <i>Ph. damselae</i> subesp. <i>piscicida</i>	Díaz-Rosales <i>et al.</i> (2009)
	<i>Sc. cerevisiae</i> , <i>D. hansenii</i>	In vivo	Adición a la dieta	Mejora de la supervivencia de larvas	Tovar-Ramírez <i>et al.</i> (2002)
	<i>D. hansenii</i>	In vivo	Adición a la dieta	Mejora de la supervivencia de larvas y reducción de malformaciones	Tovar-Ramírez <i>et al.</i> (2004)
	<i>Vg. fluvialis</i>	In vitro	-	Modulación del sistema inmune innato	Román <i>et al.</i> (2012)
	<i>Vg. fluvialis</i>	In vitro e in vivo	Adición a la dieta	Actividad antimicrobiana frente a <i>Ls. anguillarum</i> 4347 y 975-1, <i>Ph. damselae</i> subesp. <i>piscicida</i> 9499, C2 y Dt-21 y <i>Yersinia ruckeri</i> 955, adhesión a mucus de intestino e inhibición de la adhesión de <i>Ls. anguillarum</i> al mucus. Ausencia de patogenicidad en el hospedador y protección frente a <i>Ls. anguillarum</i> 975-1	Sorozza <i>et al.</i> (2012)
	<i>Vg. fluvialis</i>	In vitro	-	Modulación de la expresión de citoquinas	Román <i>et al.</i> (2013)
Mero de pínas naranjas (<i>Epinephelus coioides</i>)	<i>Bacillus pumilus</i> SE5, <i>Bacillus clausii</i> DE5	In vivo	Adición a la dieta	Mejora del crecimiento y reducción de <i>Vibrio</i> spp.	Sun <i>et al.</i> (2010)
	<i>B. subtilis</i> E20	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune y protección frente a <i>Streptococcus</i> sp. y un iridovirus	Lau <i>et al.</i> (2012)

Tabla II.5. Continuación.

Especie hospedadora	Probiótico	Tipo de ensayo	Método de administración (in vivo)	Propiedad probiótica (in vitro) y/o efecto en el hospedador (in vivo)	Referencia
Acuicultura marina					
Peces					
Róbalo común (<i>Centroponus undecimalis</i>)	<i>B. subtilis</i> 48	In vivo	Adición al agua de cultivo y reducción de la salinidad	Reducción de los niveles de <i>Vibrio</i> spp.	Kennedy <i>et al.</i> (1998)
Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	In vivo	Alimento vivo con rotíferos (<i>Br. plicatilis</i>)	Ganancia de peso de larvas	Gatesoupe (1991)
	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Camobacterium</i> sp.	In vivo	Alimento vivo con rotíferos (<i>Br. plicatilis</i>)	Protección frente a vibrosis	Gatesoupe (1994)
	Bacterias marinas (4-44, PBS2)	In vivo	Adición al agua de cultivo de larvas de rodaballo y por alimento vivo con rotíferos (<i>Br. plicatilis</i>)	Colonización de larvas	Makridis <i>et al.</i> (2000)
	Bacterias marinas, <i>Vibrio mediterranei</i> Q40	In vivo	Adición al agua de cultivo	Mejora de la supervivencia de larvas	Huys <i>et al.</i> (2001)
	<i>P. acidilactici</i>	In vitro e in vivo	Adición al agua de cultivo de rodaballo y de microalgas (<i>Isachrysis galbana</i>) y por alimento vivo con rotíferos (<i>Br. plicatilis</i>)	Actividad antimicrobiana frente a <i>Vibrio splendidus</i> . Estudio de vías de administración del probiótico en larvas	Villamil <i>et al.</i> (2010)
	<i>Roseobacter</i> spp., <i>Vibrio</i> spp.	In vitro e in vivo	Adición al agua de cultivo	Actividad antimicrobiana frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>V. splendidus</i> . Seguridad in vivo en larvas	Hjeltnes <i>et al.</i> (2004)
	<i>Roseobacter</i> sp. 27-4	In vivo	Alimento vivo con rotíferos (<i>Br. plicatilis</i>)	Ausencia de patogenicidad en el hospedador y protección frente a <i>Escherichia coli</i>	Phan <i>et al.</i> (2006)
Moluscos					
Ostra japonesa (<i>Crassostrea gigas</i>)	<i>A. media</i>	In vivo	Adición al agua de cultivo	Reducción de la proliferación de <i>Vibrio tubiashii</i>	Gibson <i>et al.</i> (1998)
Veíra (<i>Pecten maximus</i>)	<i>Alteromonas haloplanktis</i>	In vivo	Baño en suspensión bacteriana	Protección frente a <i>Escherichia coli</i>	Riquelme <i>et al.</i> (1996)
	<i>Roseobacter</i> BS107	In vitro e in vivo	Adición al agua de cultivo	Actividad antimicrobiana frente a <i>Vibrio</i> spp., <i>Xanthomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp. y <i>Aeromonas</i> spp. Mejora de la supervivencia de larvas	Ruiz-Font <i>et al.</i> (1999)
Crustáceos					
Artemia (<i>Artemia</i> spp.)	Bacterias de la familia Vibrionaceae y géneros <i>Moraxella</i> y <i>Kurtzia</i>	In vivo	Adición al agua de cultivo	Protección frente a <i>V. alginolyticus</i> en cultivos suplementados con un alimento y-irradiado	Verschuer <i>et al.</i> (2006)
	<i>Lactobacillus casei</i> CECT4043, <i>Lactobacillus brevis</i> CECT5815, <i>Lactobacillus helveticus</i> CECT541, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CECT539, <i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> CECT4046, <i>P. acidilactici</i> NRRL B-5627	In vitro e in vivo	Adición al agua de cultivo	Actividad antimicrobiana frente a <i>V. alginolyticus</i> . Reducción del ictopatógeno en artemia y agua de cultivo	Villamil <i>et al.</i> (2003)
Camaron blanco del Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	<i>Saccharomyces boulardii</i>	In vivo	Adición al agua de cultivo	Protección frente a <i>V. harveyi</i>	Patra y Mohamed (2003)
	<i>Bacillus</i> sp. LNS2, <i>A. hydrophila</i> LNS3	In vivo	Adición al agua de cultivo	Protección frente a <i>Vibrio campbellii</i> en cultivos suplementados con levaduras de calidad media y alta	Marques <i>et al.</i> (2006b)
	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. dextrinicus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. mesenteroides</i>	In vivo	Adición al agua de cultivo	Protección frente a <i>V. alginolyticus</i> en cultivos suplementados con un complemento comercial	Lamari <i>et al.</i> (2014)
	<i>Phaffia rhodozyma</i>	In vivo	Adición a la dieta	Protección frente a <i>Vibrio</i> spp.	Scholez <i>et al.</i> (1999)
	<i>Vibrio</i> sp. P62, <i>Bacillus</i> sp. P64	In vitro e in vivo	Adición al agua de cultivo	Actividad antimicrobiana frente a <i>V. harveyi</i> . Ausencia de patogenicidad en el hospedador, mejora del crecimiento y/o estimulación de la respuesta inmune	Cullian <i>et al.</i> (2004)
	<i>V. alginolyticus</i> UTM 102, <i>Phaeobacter gallacensis</i> SLW03, <i>Pseudomonas aestuvaria</i> SLV22	In vivo	Adición a la dieta	Protección frente a <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Balcázar <i>et al.</i> (2007)

Tabla II.5. Continuación.

Especie hospedadora	Probiótico	Tipo de ensayo	Método de administración (in vivo)	Propiedad probiótica (in vitro) y/o efecto en el hospedador (in vivo)	Referencia
Acuicultura marina					
Crustáceos					
Camarón blanco del Pacífico (<i>Litopenaeus setiferus</i>)	<i>Lb. plantarum</i> T-40 (NTU 102)	In vivo	Adición a la dieta	Modulación del sistema inmune y protección frente a <i>V. alginolyticus</i>	Chiu <i>et al.</i> (2007)
	<i>B. subtilis</i> L10, <i>B. subtilis</i> G1	In vivo	Adición a la dieta	Mejora del crecimiento, expresión de genes de inmunidad y protección frente a <i>V. harveyi</i>	Zakaefar <i>et al.</i> (2012)
Langostino jumbo (<i>Penaeus monodon</i>)	<i>Bacillus</i> sp.	In vivo	Adición al agua de cultivo	Protección frente a <i>Vibrio</i> spp. luminiscentes	Monarty (1998)
	<i>Bacillus</i> sp. S11	In vivo	Adición a la dieta	Estimulación del sistema inmune y protección frente a <i>V. harveyi</i>	Rengpipat <i>et al.</i> (1999)
	<i>Pseudomonas</i> sp. I-2	In vitro e in vivo	Adición al agua de cultivo	Actividad antimicrobiana frente a <i>V. harveyi</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. damsela</i> y <i>V. vulnificus</i> . Ausencia de patogenicidad in vivo	Chythanya <i>et al.</i> (2002)
Langostino marfil (<i>Penaeus latisulcatus</i>)	<i>Pseudomonas syzyxantha</i> , <i>Ps. aeruginosa</i>	In vivo	Adición a la dieta y al agua de cultivo	Mejora de la supervivencia e índice de conversión y modulación del sistema inmune	Hai <i>et al.</i> (2009)

Adaptada de Kesarcodi-Watson *et al.* (2008) y Pérez-Sánchez *et al.* (2014).

II.3.5.3. Levaduras

La principal especie de levadura propuesta como probiótico en acuicultura es *Sc. cerevisiae*, aunque en los últimos años está teniendo un gran interés el estudio de la levadura *D. hansenii* para su empleo como probiótico en peces. Los principales efectos beneficiosos de *Sc. cerevisiae* son la mejora del crecimiento y supervivencia y la estimulación del sistema inmune de los peces. Ortuño *et al.* (2002) observaron que *Sc. cerevisiae* estimulaba el sistema inmunitario innato de la dorada. Lara-Flores *et al.* (2003) describieron un mayor crecimiento en tilapias alimentadas con dietas suplementadas con esta levadura. Resultados similares fueron observados en trucha arcoíris (Sheikhzadeh *et al.*, 2012) y juveniles de esturión beluga (*Huso huso*) (Hoseinifar *et al.*, 2011) alimentados con *Sc. cerevisiae*. Tovar-Ramírez *et al.* (2004) describieron una mayor tasa de supervivencia y menor porcentaje de malformaciones en larvas de lubina alimentadas con *D. hansenii* comparadas con larvas del grupo control. Finalmente, Reyes-Becerril *et al.* (2008a) demostraron que la dieta suplementada con esta levadura estimulaba el sistema inmune de la dorada, especialmente a nivel celular.

II.3.5.4. Algas unicelulares

Las algas unicelulares también se han estudiado como probióticos para su empleo en acuicultura por presentar actividad antimicrobiana frente a ictiopatógenos y estimular el sistema inmune. Austin *et al.* (1992) observaron una reducción de la mortalidad de salmones del Atlántico alimentados con *Tetraselmis suecica* e infectados con *A. salmonicida*, *Serratia liquefaciens*, *Ls. anguillarum*, *V. salmonicida* y *Y. ruckeri*. Díaz-Rosales *et al.* (2008) observaron que la administración de *Porphyridium cruentum* estimulaba el estallido respiratorio de los leucocitos de lenguado senegalés. Cerezuela *et al.* (2012) también observaron que la administración de *Nannochloropsis gaditana* y *Tetraselmis chuii* a doradas aumentaba la actividad del complemento, la capacidad fagocítica de los leucocitos y la expresión de algunos genes relacionados con la inmunidad, mientras que la adición de *Phaeodactylum tricornutum* aumentaba la actividad del complemento, estallido respiratorio y capacidad fagocítica de los leucocitos pero no la expresión de los genes de inmunidad.

II.3.6. PRINCIPALES PREPARACIONES COMERCIALES EMPLEADAS COMO PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA

Conviene destacar que algunos de los probióticos empleados en acuicultura se han seleccionado con base en su eficacia demostrada previamente en humanos y animales y que actualmente existen varios productos comerciales que alegan propiedades probióticas para los peces y el medio acuático (Tabla II.6). En este sentido, BACTOCELL® es el único probiótico autorizado hasta la fecha en Europa para el cultivo intensivo de peces y gambas (sección II.4.4.1).

Tabla II.6. Preparaciones probióticas comerciales empleadas en acuicultura.

Producto/ Compañía	Aplicación	Beneficios	Microorganismos
ALKEN CLEARFLO® 1006/ Alken Murray	Aditivo para el agua de gambas	Mejora la digestión y la conversión del alimento, estimula la respuesta inmune y mejora la calidad del agua	Mezcla de <i>Bacillus</i> spp. y bacterias Gram-negativas
AQUAPROP-B/ AquaInTech Inc.	Aditivo para el agua de peces y gambas	Degrada la materia orgánica y mejora la calidad del agua	Mezcla de <i>Bacillus</i> spp.
AQUAPROP-F/ AquaInTech Inc.	Aditivo para el pienso de peces y gambas	Mejora la digestión y controla el desarrollo de <i>Vibrio</i> spp.	<i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> , manano-oligosacáridos y enzimas
AQUA PROTECH/ GRM Ltd.	Aditivo para el pienso de peces y gambas	Mejora la microbiota intestinal, mejora la utilización del alimento, estimula la respuesta inmune y reduce la incidencia de enfermedades y la mortalidad	<i>Sc. cerevisiae</i> y otros compuestos (complejo mineral de hierbas, espirulina, algas marinas, enzimas y vitaminas)
BACTA-PUR® N3000/ IET-Aquaresearch	Aditivo para el agua de peces	Mejora la calidad del agua y reduce los niveles de amonio, nitratos, nitritos y fosfatos solubles	Mezcla de bacterias nitrificantes
BACTOCELL®/ Lallemand	Aditivo para el pienso para peces y gambas	Mejora la producción de salmónidos y gambas	<i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM MA 18/5 M
EFINOL I®/ Bentoli Inc.	Aditivo para el agua de larvas de peces y gambas	Reduce el estrés y mejora las tasas de supervivencia de larvas	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Sc. cerevisiae</i> , vitaminas, aminoácidos y enzimas
EFINOL PT®/ Bentoli Inc.	Aditivo para el agua o el pienso de peces y gambas	Reduce el estrés, minimiza la mortalidad durante la aparición de enfermedades. Mejora la uniformidad y rendimiento de las especies acuáticas, ayuda a mantener un balance microbiano favorable y las condiciones de la calidad del agua en estanques	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Sc. cerevisiae</i>
PRO4000X tablets/ Aqua-in-tech	Aditivo para el agua o el pienso de peces y gambas	Mejora la calidad del agua, reduce el nivel de amonio y controla el desarrollo de <i>Vibrio</i> spp.	<i>B. subtilis</i> y <i>B. licheniformis</i>
PROGUT/ Som Phytopharma India Ltd., Bio-Ops Bio Ops	Aditivo para el pienso de peces	Mejora la digestibilidad del pienso, mejora la supervivencia, reduce los microorganismos patógenos	Bacterias lácticas, <i>Bacillus</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Trichoderma reesei</i>
PROWASO/ Som Phytopharma India Ltd., Bio-Ops	Aditivo para el agua de peces	Mejora la calidad del agua como método preventivo de enfermedades	<i>Rhodococcus</i> spp., <i>Rhodobacter</i> spp., <i>Nitrosomonas</i> spp., <i>Nitrobacter</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Trichoderma reesei</i>
SANOLIFE® MIC-F/ Inve	Aditivo para el agua (dulce y marina) de larvas de peces, artemias y rotíferos	Produce enzimas, degrada los productos de desecho, mejora la calidad del agua en criaderos de larvas y producción de alimento vivo y optimiza la microbiota intestinal	Mezcla de <i>Bacillus</i> spp.
TOARAZE®/ Pharmaceutical Company of Japan	Mezclado en el pienso para anguilas y gambas	Inhibe patógenos en el tracto gastrointestinal, mejora la efectividad del alimento, la calidad del agua y el crecimiento general. Mejora el rendimiento de la acuicultura	<i>Enterococcus faecalis</i> T-110, <i>Cl. butyricum</i> TO-A y <i>Bacillus mesentericus</i> TO-A
UB-AQUACARE/ Unique Biotech Limited	Aditivo para el agua de peces y gambas	Mejora la calidad del agua, degrada la materia orgánica, reduce los niveles de amoníaco, mejora el crecimiento, controla el desarrollo de microorganismos patógenos y mejora la oxigenación	Probiótico líquido con 12 cepas de bacterias aerobias y anaerobias
VIBRIOCHECK/ Bio Ops	Aditivo para el agua de peces y gambas	Controla el desarrollo de <i>Vibrio</i> spp.	Mezcla de microorganismos

Adaptada de Lauzon (2010) y Gómez-Sala (2013).

II.4. BACTERIAS LÁCTICAS

II.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos muy heterogéneo desde el punto de vista morfológico, fisiológico y filogenético, pertenecientes al grupo clostridial de las eubacterias Gram-positivas (contenido de G+C <55 mol%), con exigentes requerimientos nutritivos y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de la fermentación de los hidratos de carbono. En general, las bacterias lácticas son microorganismos de morfología cocoide, bacilar o cocobacilar, no esporulados, catalasa-negativos, carentes de citocromos, microaerófilos o anaerobios facultativos, ácido-tolerantes y estrictamente fermentativos (Stiles y Holzapfel, 1997; Wright y Axelsson, 1998; Klein *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c; Carr *et al.*, 2002; Wright y Axelsson, 2012).

En la actualidad, los géneros bacterianos comprendidos en el grupo de las bacterias lácticas pertenecen a la familia *Lactobacillales*, orden *Bacilli* del filo *Firmicutes* y son los siguientes: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Pot *et al.*, 1994; Stiles y Holzapfel, 1997; Axelsson *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c, 2001; Claesson *et al.*, 2007; Ogier *et al.*, 2008; Ogier y Serró, 2008; de Vos *et al.*, 2009). Tradicionalmente, también se consideraba al género *Bifidobacterium* como perteneciente al grupo de las bacterias lácticas ya que posee las características morfológicas y fisiológicas de este grupo microbiano; no obstante, las bifidobacterias están más relacionadas filogenéticamente con el grupo actinomiceto de las eubacterias Gram-positivas (contenido de G+C >55 mol%) y además poseen una ruta especial para la fermentación de los azúcares, específica para este género (catalizada por la enzima fructosa-6-fosfato fosfoetolasa), lo que las separa claramente del grupo de las bacterias lácticas (Axelsson *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c).

Las bacterias lácticas se localizan en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de hidratos de carbono solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno, como pueden ser diversos alimentos como la leche y los productos lácteos, la carne y los productos cárnicos fermentados, el pescado y los derivados de la pesca, las frutas y hortalizas frescas, los productos vegetales fermentados, los ensilados y diversas bebidas. Sin embargo, estos microorganismos también forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal y urogenital y de las mucosas de los mamíferos. Además, algunas bacterias lácticas también se han aislado del estiércol y de las aguas residuales urbanas e industriales (Aguirre y Collins, 1993; Axelsson *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c; Carr *et al.*, 2002; von Wright y Axelsson, 2012).

II.4.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas, además de su función tecnológica, poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos alterantes y/o patógenos presentes potencialmente en los alimentos e impedir la colonización del tracto digestivo del hombre y de los animales por microorganismos patógenos. El efecto antimicrobiano primario de las bacterias lácticas se debe a la competencia por los nutrientes del sustrato y a la formación de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético, principalmente), con el consiguiente descenso del pH. No obstante, las bacterias lácticas también producen otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, isómeros D de los aminoácidos, reuterina y otros compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular, y, por último, sustancias proteicas de síntesis ribosomal denominadas bacteriocinas (Daeschel, 1989; Piard y Desmazeaud, 1991, 1992; de Vuyst y Vandamme, 1994; Adams y Nicolaidis, 1997; Cintas y Casaus, 1998; Ouwehand, 1998; Caplice y Fitzgerald, 1999; Lücke, 2000; Cintas *et al.*, 2000a, 2000b, 2001; Ross *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006; Gálvez *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2012). De las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente para la bioconservación de los alimentos (sección II.4.2.1), ya que por su naturaleza proteica podrían ser degradadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal mientras que permanecerían activas en los sustratos alimenticios y, además, no parecen ser tóxicas ni inmunógenas (Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2000b).

II.4.2.1. Bacteriocinas: definición y clasificación

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, producidos y secretados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y que poseen actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática) (Joerger *et al.*, 2000; O’Keeffe y Hill, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Hill y O’Keeffe, 2003; Gálvez *et al.*, 2007; Nishie *et al.*, 2012). Las bacteriocinas de las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas de síntesis ribosomal que varían en sus propiedades físico-químicas, espectro de acción antimicrobiana, modo de acción, mecanismos responsables de su inmunidad, biosíntesis, procesamiento, transporte y regulación de su producción y en la organización molecular de los determinantes genéticos implicados en estos procesos (Martínez *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2000b, 2000d, 2001; Diep y Nes, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Nes *et al.*, 2012; Nishie *et al.*, 2012). Durante los últimos años, debido a la posible aplicación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas en la bioconservación de los alimentos o como agentes terapéuticos, se ha producido un extraordinario avance en su investigación, lo que ha permitido elucidar su estructura, sus características físico-químicas, su modo de acción, la

localización de sus determinantes genéticos y los mecanismos de biosíntesis, procesamiento, secreción, inmunidad y regulación (Sablon *et al.*, 2000; Oscáriz y Pisabarro, 2001; Nes *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2010; Bakkal *et al.*, 2012; Nishie *et al.*, 2012).

A pesar de su heterogeneidad, las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas presentan una serie de características comunes que permiten agruparlas en alguna de las tres clases principales descritas para las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas (Nes *et al.*, 1996; Diep y Nes, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Nes *et al.*, 2007; Nishie *et al.*, 2012):

1. Clase I (lantibióticos). Bacteriocinas policíclicas de pequeño tamaño molecular (<5 kDa), termoestables y con aminoácidos poco usuales resultantes de modificaciones postraduccionales (Sahl y Bierbaum, 1998; Guder *et al.*, 2000; Pag y Sahl, 2002; Twomey *et al.*, 2002; Chatterjee *et al.*, 2005; Dufour *et al.*, 2007; Alkhatib *et al.*, 2012; Knerr y van de Donk, 2012). Las modificaciones postraduccionales más comunes son: (i) la deshidratación de residuos de serina (Ser) y treonina (Tre), que origina dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb), respectivamente, y (ii) la condensación de residuos Dha y Dhb con grupos sulfhidrido de residuos de cisteína (Cys) cercanos, lo que origina lantionina (Lan) y β -metil-lantionina (MeLan), respectivamente. El prototipo de esta clase es la nisina A (NisA), que, además, es la bacteriocina mejor caracterizada hasta la fecha y la única aceptada internacionalmente como aditivo alimentario en determinados alimentos (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Davies y Delves-Broughton, 2000; Cheigh y Pyun, 2005). En función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen, a su vez, en dos grupos:
 - a. Tipo Ia. Lantibióticos elongados, flexibles y catiónicos que actúan a nivel de membrana plasmática formando poros. Este grupo se subdivide en: (i) subgrupo Ia1, que incluye los lantibióticos elongados cuya secuencia líder, del tipo FNLDV, es procesada por una serín-proteasa (*e.g.*, NisA y nisina Z [NisZ]), y (ii) subgrupo Ia2, que incluye los lantibióticos elongados cuya secuencia líder, del tipo “doble glicina”, es procesada por un transportador del tipo ABC, como es el caso de Ltn481 y de todos los sistemas de dos péptidos (*e.g.*, citolisina [Cyl]), cuya actividad total depende de la acción complementaria de dos péptidos con actividad antimicrobiana débil de manera individual, pero potente cuando actúan conjuntamente (Nagao *et al.*, 2006; Lawton *et al.*, 2007; Smith y Hillman, 2008).
 - b. Tipo Ib. Lantibióticos globulares, aniónicos o neutros e hidrófobos, inmunológicamente activos, que actúan como inhibidores de enzimas (*e.g.*, mersacidina, cinamicina, actagardina y duramicinas B y C). Conviene destacar que, hasta la fecha, no se ha

descrito ningún lantibiótico de este tipo producido por bacterias lácticas (Skaugen *et al.*, 2003).

2. Clase II (no lantibióticos). Bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<10 kDa), termoestables, con un punto isoelectrico elevado (pI 8–11), sin aminoácidos modificados postraduccionalmente y que actúan a nivel de la membrana citoplasmática (Nes y Holo, 2000; Nes *et al.*, 2002; Drider *et al.*, 2006; Nissen-Meyer *et al.*, 2009; Kjos *et al.*, 2011). Tradicionalmente las bacteriocinas de la clase II se han subdividido en tres grupos:
 - a. Subclase IIa (bacteriocinas del tipo/familia pediocina). Bacteriocinas con una potente actividad anti-*Listeria* y con un elevado grado de homología estructural (40–60%), especialmente en la región N-terminal, en la que se incluye la secuencia consenso conservada YGNGVXCX₄CXV (donde X representa un residuo aminoacídico no conservado) que incluye dos residuos Cys que forman un puente disulfuro esencial para la actividad antimicrobiana (*e.g.*, sakacina P [SakP]) (Ennahar *et al.*, 1999; Ennahar *et al.*, 2000; Fimland *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2012). El espectro de acción de las bacteriocinas de esta subclase es muy amplio e incluye generalmente tanto a otras bacterias lácticas como a microorganismos patógenos y alterantes presentes en los alimentos (*Bacillus* spp., *Brochothrix* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp. y *Staphylococcus* spp.). El prototipo de este grupo es la pediocina PA-1 (PedPA-1) (Henderson *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 1998b), que es la bacteriocina de las bacterias lácticas mejor caracterizada después de la NisA.
 - b. Subclase IIb (sistemas de dos péptidos). Bacteriocinas cuya actividad antimicrobiana total depende de la acción complementaria de dos péptidos (Cintas *et al.*, 1998a; Garneau *et al.*, 2002; Oppegård *et al.*, 2007; Nissen-Meyer *et al.*, 2010). Estos sistemas se clasifican, a su vez, en dos tipos: (i) sistemas en los que los dos péptidos no poseen actividad antimicrobiana independiente, por lo que es necesaria su presencia simultánea para que la bacteriocina sea activa (*e.g.*, lactococcina G [α y β]), y (ii) sistemas en los que uno o ambos péptidos son activos independientemente, pero cuya actividad aumenta notablemente en presencia del otro péptido (*e.g.*, lactacina F [A y B] y enterocina L50 [L50A y L50B], respectivamente).
 - c. Subclase IIc. Bacteriocinas de la clase II que no se incluyen en ninguna de las subclases anteriores (*e.g.*, carnobacteriocina A [CbnA], enterocina B [EntB] y enterocina Q [EntQ]).
3. Clase III. Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles (inactivadas con tratamientos térmicos a 60–100°C durante 10–15 min) (*e.g.*, helveticina J y enterolisina A [EnlA]).

Conviene destacar que Klaenhammer (1993) propuso la existencia de una cuarta clase, compuesta por bacteriocinas complejas e integradas por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucídicas necesarias para su actividad biológica. No obstante, antes de reconocer a esta clase como independiente, debe completarse la caracterización bioquímica de todas las bacteriocinas inicialmente adscritas a la misma, purificándolas a homogeneidad, ya que en algunos casos, tras su purificación se demostró que su naturaleza era exclusivamente peptídica (Jiménez-Díaz *et al.*, 1995). Por otra parte, Kemperman *et al.* (2003) sugirieron la existencia de una nueva clase constituida por bacteriocinas con una estructura cíclica resultante de la formación de un enlace peptídico entre las regiones N- y C-terminal de la molécula y que no presentan aminoácidos modificados postraduccionalmente (*e.g.*, circularina A [CirA], EntAS-48, gassericina A [GasA] y reutericina 6) (Kawai *et al.*, 2004; Maqueda *et al.*, 2004; Maqueda *et al.*, 2008); no obstante, en dos revisiones recientes estas bacteriocinas se han incluido como una subclase de la clase II (Cotter *et al.*, 2005; Nes *et al.*, 2007). Asimismo, Cotter *et al.* (2005) designaron a todos los compuestos termolábiles y de elevado tamaño molecular, tradicionalmente agrupados en la clase III, como bacteriolisinas (hidrolasas de la mureína), excluyéndolos así del grupo de las bacteriocinas, ya que difieren de las bacteriocinas tradicionales en: (i) su mecanismo de acción, ya que provocan la lisis celular mediante la hidrólisis de la pared bacteriana; (ii) su estructura modular, compuesta por un dominio N-terminal catalítico con homología con endopeptidasas y un dominio C-terminal implicado en el reconocimiento de su diana celular, y (iii) la posible ausencia de gen(es) de inmunidad en sus operones, ya que la inmunidad de la célula productora puede depender de modificaciones en su pared bacteriana. Por otra parte, Nes *et al.* (2007) clasificaron a las bacteriocinas en dos grandes grupos (clase I, lantibióticos y clase II, no lantibióticos) y a su vez, las pertenecientes a la clase II las subdividieron en cuatro subclases: (i) IIa (bacteriocinas del tipo/familia pediocina); (ii) IIb (sistema de dos péptidos); (iii) IIc (bacteriocinas sin extensión N-terminal), y (iv) IId (bacteriocinas con estructura cíclica). No obstante, de Vuyst y Leroy (2007) agruparon a las bacteriocinas de la clase II en sólo tres subclases: (i) IIa (bacteriocinas del tipo/familia pediocina); (ii) IIb (sistema de dos péptidos), y (iii) IIc (bacteriocinas con estructura cíclica); sin embargo van Belkum y Stiles (2000) propusieron una subdivisión de la clase II en seis subclases. Recientemente, Zouhir *et al.* (2010) propusieron una clasificación basada en una nueva caracterización de las secuencias según su estructura, lo cual permite agrupar las bacteriocinas en 12 grupos. Por último, Cui *et al.* (2012) propusieron clasificar a las bacteriocinas de la clase IIa en ocho subgrupos en función de su secuencia consenso conservada, su estructura 3D y su mecanismo de acción. De todo lo descrito anteriormente, se desprende la existencia de numerosas discrepancias a la hora de clasificar las bacteriocinas, lo que es debido tanto a la diversidad bioquímica de las mismas como a los criterios seleccionados para su clasificación.

II.4.3. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

II.4.3.1. Bacterias lácticas y alimentos

Los alimentos fermentados han sido consumidos por la humanidad desde tiempos inmemoriales y parecen tener su origen en la civilización Sumeria (5.000–4.000 a.C.). Tradicionalmente, estos alimentos fermentados se elaboraban mediante procesos empíricos basados en la actividad de la microbiota presente de forma natural en las materias primas (fermentaciones naturales) (Cintas y Casaus, 1998). En la actualidad, estos productos incluyen más de 3.500 variedades, elaboradas a partir de materias primas como la leche, frutas, vegetales, raíces, cereales, carne y pescado, entre los que pueden citarse: (i) derivados de la leche fermentada (*e.g.*, queso, yogur y kéfir); (ii) pan y derivados de cereales fermentados (*e.g.*, *sourdough* [derivado de diversos cereales] y *ogi* [derivado del maíz o sorgo]); (iii) bebidas (*e.g.*, vino, cerveza y diversos licores); (iv) derivados de vegetales fermentados (*e.g.*, ensilados, *kimchi* [derivado de la col y otros vegetales], *sauerkraut* [derivado de la col] y *tempeh* [derivado de la soja]), y (v) derivados del pescado fermentado. Sin embargo, hasta mediados del siglo XIX Pasteur no demostró que los microorganismos eran los responsables de los procesos fermentativos que tenían lugar en todos estos alimentos (Stiles, 1996; Caplice y Fitzgerald, 1999; Lücke, 2000; Ross *et al.*, 2002; Franz y Holzapfel, 2012; Park y Kim, 2012; Salovaara y Gänzle, 2012).

Actualmente, las fermentaciones industriales son procesos estrictamente controlados basados en la adición deliberada a la materia prima de cultivos de microorganismos específicos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras), lo que permite garantizar y estandarizar las características organolépticas y reológicas del producto final, así como potenciar su calidad higiénico-sanitaria y alargar su vida útil (Cintas y Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 2000a). Además, el empleo de la fermentación como tecnología alimentaria cumple varias funciones: (i) enriquecimiento de la dieta humana debido a la amplia diversidad de alimentos generados; (ii) conservación de los alimentos derivada de la fermentación láctica, alcohólica o acética; (iii) enriquecimiento de las materias primas con vitaminas, proteínas y aminoácidos y ácidos grasos esenciales; (iv) detoxificación, y (v) descenso del tiempo requerido para su preparación (Steinkraus, 2002; Giraffa, 2004). Estos microorganismos, que se añaden a las materias primas para la obtención de alimentos fermentados, pueden clasificarse en función de su finalidad principal en: (i) cultivos iniciadores, que se adicionan para inducir cambios en la textura, aroma, sabor, color, digestibilidad y palatabilidad de las materias primas, permitiendo así la obtención de unos productos finales con unas características organolépticas y reológicas diferentes y deseables (Buckenhüskes, 1993; Geisen y Holzapfel, 1996; Stiles, 1996; Cintas y Casaus, 1998; Hugas, 1998; Lücke, 2000; Tamine, 2002; O’Sullivan *et al.*, 2002; Leroy y Vuyst, 2004; Smit *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2006); (ii) cultivos protectores, adicionados para garantizar la calidad higiénico-sanitaria y seguridad de los alimentos, así como para incrementar su vida útil, mediante la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes presentes en los alimentos debido a la

competencia por los nutrientes del sustrato y la producción de diversos metabolitos (II.4.2) (Holzapfel *et al.*, 1995; Geisen y Holzapfel, 1996; Lücke, 2000; Rodgers, 2001; Rodgers *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2002; Työppönen *et al.*, 2003; Vermeiren *et al.*, 2004), y (iii) cultivos adjuntos (también denominados cultivos iniciadores adjuntos), adicionados con una finalidad distinta a las anteriores, como puede ser la aceleración de la maduración mediante la lisis celular de los cultivos iniciadores durante la elaboración de determinados tipos de quesos y la producción del sabor y aroma deseado (O'Sullivan *et al.*, 2002).

II.4.3.1.1. Aspectos negativos de la presencia de bacterias lácticas en los alimentos

La actividad metabólica de las bacterias lácticas provoca, en algunas ocasiones, la alteración de determinados alimentos cuando estos microorganismos se convierten en la microbiota dominante durante su almacenamiento, como es el caso de: (i) carnes o pescados envasados en condiciones de anaerobiosis o atmósferas modificadas, en las que producen acidez, sabores y olores defectuosos, exudados lechosos y limosidad, la hinchazón de los envases por producción de gas y decoloración (Borch *et al.*, 1996; Björkroth *et al.*, 2000; Samelis *et al.*, 2000; Joffraud *et al.*, 2001; Lyhs *et al.*, 2001; Vermeiren *et al.*, 2004; Lyhs y Björkroth, 2008); (ii) ciertos vinos en los que la fermentación maloláctica es indeseable, ya que producen agriado, sabores defectuosos, turbidez, lodos, decoloración y viscosidad; estas alteraciones también pueden producirse por el desarrollo de otras bacterias lácticas que no intervienen en la fermentación maloláctica (Daeschel *et al.*, 1991; Fleet, 1999, 2001), y (iii) cervezas, en las que provocan la aparición de acidez excesiva, sabores y aromas defectuosos, turbidez, filamentosidad, sedimentos, viscosidad y decoloración (Jespersen y Jakobsen, 1996; Campbell, 1997; Hartnett *et al.*, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; March *et al.*, 2005).

Por otra parte, las enzimas descarboxilasas de algunas bacterias lácticas presentes en los alimentos pueden provocar la formación de aminas biógenas (*e.g.*, histamina, tiramina, putrescina y cadaverina), que son sustancias psico- y vasoactivas. A este respecto, conviene destacar que, a pesar de que la presencia de estas sustancias es común en los alimentos fermentados (*e.g.*, queso, vino, cerveza y embutidos crudos curados), su ingestión en grandes cantidades, o en cantidades normales por las personas sensibles, puede originar cuadros toxicológicos (náuseas, alteraciones respiratorias, sofocos, sudoración, palpitaciones, cefaleas, erupciones cutáneas e hiper- o hipotensión) (Giraffa, 2002; Suzzi y Gardini, 2003). Asimismo, algunas especies de pescado están asociadas a un alto contenido de histidina (*e.g.*, atún, bonito, caballa, salmón, sardina y arenque), y por ello la UE, mediante el Reglamento (CE) Nº 1441/2007, de la Comisión de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, ha establecido un límite máximo del contenido de histamina (200 mg/kg) para especies de pescado pertenecientes a las familias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* y *Scombresosidae*. En condiciones inadecuadas de conservación o refrigeración, la musculatura de estos peces de carne oscura sufre descomposición bacteriana produciéndose la descarboxilación de la

histidina, y consecuentemente, la formación de histamina. La ingestión de pescado con altas concentraciones de esta amina biógena puede dar lugar a lo que se denomina intoxicación por escómbridos o escombroidosis, siendo ésta una de las formas más frecuentes de intoxicación por pescado y cuyos síntomas recuerdan a una reacción alérgica (Hijano Baola *et al.*, 2005).

II.4.3.2. Bacterias lácticas y salud

II.4.3.2.1. Bacterias lácticas como cultivos probióticos

La mayoría de las preparaciones probióticas (especialidades farmacéuticas), de los alimentos probióticos (alimentos infantiles, leche y derivados lácteos) y de los aditivos alimentarios para animales incluyen microorganismos del género *Bifidobacterium* y del grupo de las bacterias lácticas (sección II.4.4), principalmente del género *Lactobacillus*. Sin embargo, algunas cepas de las especies *E. faecium* y *E. faecalis* también se emplean ocasionalmente como probióticos en humanos y animales (Holzapfel *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998; Holzapfel y Schillinger, 2002; Leroy *et al.*, 2006; Stolaki *et al.*, 2012). El hecho de que las bacterias lácticas se utilicen como probióticos se debe a su consideración, generalmente, como microorganismos seguros (estatus GRAS o estatus QPS) (EFSA, 2004, 2005a, 2005b, 2007, 2011).

Entre los numerosos efectos beneficiosos derivados del consumo de probióticos se incluyen: (i) mantenimiento y restauración de la microbiota intestinal normal, previniendo y reduciendo las alteraciones gastrointestinales; (ii) inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos; (iii) fortalecimiento de la barrera de la mucosa intestinal; (iv) actividades antimutagénicas y anticarcinogénicas; (v) modulación del sistema inmune; (vi) reducción del nivel de colesterol sanguíneo; (vii) actividad antioxidante; (viii) mejora en la absorción del calcio; (ix) aumento de la síntesis de vitaminas y mejora de la predigestión de proteínas; (x) acción antihipertensiva; (xi) disminución de las infecciones urogenitales y de las úlceras causadas por *H. pylori*; (xii) tratamiento de las diarreas causadas por viajes a zonas tropicales y tratamiento excesivo con antibióticos; (xiii) control de colitis provocada por rotavirus y *Cl. difficile*; (xiv) mejora de la calidad nutritiva de los alimentos; (xv) mejora de la digestibilidad de la lactosa; (xvi) modulación del estrés y mejora de los síntomas de ansiedad, y (xvii) regulación de la respuesta emocional (Holzapfel *et al.*, 1998; Ouwehand, 1998; Gardiner *et al.*, 2002; Holzapfel y Schillinger, 2002; Wallace *et al.*, 2003; Amores *et al.*, 2004; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ljungh y Wadström, 2006; Bujalance *et al.*, 2007; Falagas *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2009; Silk *et al.*, 2009; Bravo *et al.*, 2011; Gill *et al.*, 2012; Lyra *et al.*, 2012; Miller y Reid, 2012; Szajewska, 2012).

II.4.3.2.2. Bacterias lácticas como vacunas orales

Mediante ingeniería genética es posible obtener bacterias lácticas recombinantes que expresen, intra, extracelularmente o unidos a la superficie celular, epítomos o determinantes antigénicos (región específica de un antígeno reconocida por los anticuerpos) de microorganismos patógenos y que, por lo tanto, puedan utilizarse como vacunas administradas por vía oral. El hecho de que las bacterias lácticas sean candidatas para el desarrollo de vacunas orales se deriva de algunas de sus propiedades como: (i) su consideración como microorganismos seguros (estatus GRAS o estatus QPS), (ii) sus propiedades adyuvantes (potenciadoras de la respuesta inmune); (iii) su capacidad de adherencia y colonización de las mucosas, y (iv) su resistencia a valores de pH ácidos (Pouwels *et al.*, 1998; Dieye *et al.*, 2003; Wells y Mercenier, 2003; Hummel *et al.*, 2007a; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011; Wells, 2011; Tarahomjoo, 2012).

II.4.3.2.3. Bacterias lácticas como productoras de sustancias nutraceuticas

De la misma manera que las bacterias lácticas pueden emplearse como biorreactores para la producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés en el sector alimentario (Billman-Jacobe, 1996; Hugenholtz *et al.*, 2002), es posible modificar, mediante ingeniería genética, determinadas rutas metabólicas de las mismas para la producción a gran escala de sustancias nutraceuticas (componentes de los alimentos que poseen efectos beneficiosos para la salud del consumidor), tales como: (i) vitaminas del grupo B (*e.g.*, riboflavina, folatos y cobalamina); (ii) edulcorantes bajos en calorías (*e.g.*, L-alanina, manitol, sorbitol y tagatosa); (iii) oligosacáridos; (iv) exopolisacáridos (EPS); (v) antioxidantes (*e.g.*, glutatión y tioredoxina), y (vi) enzimas (por ej.; β -galactosidasa) (Hugenholtz *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2006; Morello *et al.*, 2008; Maischberger *et al.*, 2010).

II.4.3.3. Bacterias lácticas y enfermedad

Los consumidores perciben a las bacterias lácticas como algo “natural” y beneficioso para la salud, por lo que su presencia en los alimentos tiene gran aceptabilidad. Dado que se aíslan frecuentemente del tracto gastrointestinal de personas sanas, la mayoría de los microorganismos de este grupo se consideran comensales. A pesar de que la mayoría de las bacterias lácticas se consideran microorganismos seguros (estatus GRAS o estatus QPS), algunas especies se han relacionado con el desarrollo de infecciones humanas (Aguirre y Collins, 1993; Gasser, 1994).

Entre las infecciones producidas por bacterias lácticas se encuentran tanto infecciones locales como sistémicas, como, por ejemplo, endocarditis infecciosa, septicemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de la cavidad torácica, infecciones del tracto digestivo y meningitis. La mayoría de las bacterias lácticas asociadas a casos clínicos pertenecen a las especies *E. faecalis* y *E. faecium*,

aunque, en ocasiones, se han descrito infecciones causadas por *Lb. acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lc. lactis*, *L. garvieae*, *P. acidilactici* y *Leuconostoc* spp. (Aguirre y Collins, 1993; Gasser, 1994; Bessis *et al.*, 1995; Donohue *et al.*, 1995; Salminen *et al.*, 1998; Adams, 1999; Cannon *et al.*, 2005; Salminen *et al.*, 2006; Claesson *et al.*, 2007; Mofredj *et al.*, 2007; Švec *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Bernardeau *et al.*, 2008; Casalta y Montel, 2008; Ogier *et al.*, 2008; Ogier y Serror, 2008; Schirrmeister *et al.*, 2009; Franz *et al.*, 2010; Iwen *et al.*, 2012). No obstante, conviene destacar que: (i) estos microorganismos actúan como patógenos oportunistas, infectando a individuos cuyas defensas están debilitadas como resultado de disfunciones del sistema inmune, quimioterapia o daño tisular, siendo además su prevalencia menor que la de otros microorganismos patógenos oportunistas, y (ii) los microorganismos implicados en estos procesos no son generalmente de origen alimentario (Adams y Marteau, 1995; Donohue *et al.*, 1995; Salminen *et al.*, 1998; Adams, 1999; Franz *et al.*, 2010). Por último, debe mencionarse que el incremento aparente de los casos de infecciones causadas por bacterias lácticas podría deberse a la combinación de un mejor diagnóstico clínico y al incremento en la supervivencia de los pacientes con inmunodeficiencias (Franz *et al.*, 2010).

En lo que respecta a los peces, también se han identificado algunas especies de bacterias lácticas (*L. garvieae*, *L. piscium*, *St. iniae*, *St. parauberis*, *St. phocae*, *St. agalactiae*, *C. maltaromaticum*, *Vg. salmoninarum*) (sección II.2.4) como agentes etiológicos de importantes procesos infecciosos que han aparecido como consecuencia de los sistemas intensivos empleados en los sistemas de acuicultura (Ringø y Gatesoupe, 1998; Padrós y Furones, 2002; Ghittino *et al.*, 2003; Toranzo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008b).

II.4.4. BACTERIAS LÁCTICAS EVALUADAS COMO PROBIÓTICOS EN ACUICULTURA

Actualmente, existe un gran interés por el empleo de bacterias lácticas como probióticos en acuicultura (Verschuere *et al.*, 2000b; Chabrilón y Moriño, 2007; Gatesoupe, 2008), debido principalmente a que: (i) la mayoría de las bacterias lácticas se consideran microorganismos seguros para el consumo animal y humano (estatus GRAS o estatus QPS); (ii) numerosas cepas de bacterias lácticas están aceptadas legalmente como probióticos para su empleo en humanos y animales de abasto; (iii) la cepa *P. acidilactici* CNCM MA 18/5M está autorizada para su empleo en acuicultura; y (iv) numerosos géneros, incluyendo *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, forman parte de la microbiota intestinal de muchos peces cultivados, especialmente de los de agua dulce (Ringø y Gatesoupe, 1998; Ringø y Holzapfel, 2000; Ringø *et al.*, 2000; EFSA, 2004, 2005a, 2005b, 2011; Austin, 2006; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). Además, se ha descrito que algunas bacterias lácticas de origen acuático producen compuestos antimicrobianos en el tracto digestivo de los peces, lo que puede contribuir a impedir su

colonización por microorganismos patógenos (Ringø y Gatesoupe, 1998; Ringø y Holzapfel, 2000; Makridis *et al.*, 2005; Austin, 2006). Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas son la competencia por los nutrientes del sustrato y la formación de ácidos orgánicos, con el consiguiente descenso del pH; no obstante, las bacterias lácticas producen además otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, diacetaldehído, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, benzoato, isómeros D de los aminoácidos, reuterina y otros compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular y, por último, bacteriocinas (sección II.4.2) (Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Fimland *et al.*, 2005). Asimismo, las BAL propuestas como probióticos en acuicultura han mostrado numerosos efectos beneficiosos derivados de su empleo, entre los que se incluyen: (i) mejora de la tasa de supervivencia tras la infección con ictiopatógenos, (ii) modulación del sistema inmune, (iii) estimulación del crecimiento; y (iv) mejora de la calidad del agua (Verschuere *et al.*, 2000b; Balcázar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008b; Martínez Cruz *et al.*, 2012; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014).

Las principales especies de BAL que se han evaluado en acuicultura pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Vagococcus*. Gatesoupe (1994) observó un aumento del crecimiento y tasa de supervivencia en larvas de rodaballo que fueron alimentados con rotíferos enriquecidos con bacterias lácticas, protegiéndoles además frente a *Vibrio* spp. En este sentido, Balcázar *et al.* (2007a) demostraron que la administración de las cepas *L. lactis* subesp. *lactis* CLFP 100, *Lc. mesenteroides* CLFP 196 y *Lb. sakei* CLFP 202 (10^6 ufc/g), aisladas de salmónidos, aumentaba la actividad fagocítica de los leucocitos, la actividad del complemento del suero y el porcentaje de supervivencia en trucha arcoíris tras la infección con *A. salmonicida*. Estas tres cepas también aumentaron la actividad del complemento en el suero de trucha común tras su administración en la dieta (Balcázar *et al.*, 2007b). Por otra parte, Vendrell *et al.* (2008) observaron que la administración a trucha arcoíris de las cepas *Lc. mesenteroides* CLFP 196 y *Lb. plantarum* CLFP 238 (10^7 ufc/g), aisladas de salmónidos, protegían frente a *L. garvieae*. Más tarde, Pérez-Sánchez *et al.* (2011b) demostraron que la administración en la trucha arcoíris de la cepa *Lb. plantarum* CLFP 3 (10^6 ufc/g), aislada de esta misma especie, también protegía frente a la lactococosis, aumentando los transcritos de IL-10, IL-8 e IgT. Giri *et al.* (2013) observaron que la administración de la cepa *Lb. plantarum* VSG3 (10^6 , 10^8 y 10^{10} ufc/g), aislada de labeo roho, mejoraba los niveles de lisozima y la actividad del complemento en el suero, la actividad fagocítica y el estallido respiratorio de los leucocitos y el índice de crecimiento y tasa de supervivencia tras la infección con *A. hydrophila* en labeo roho.

Algunas bacterias lácticas empleadas como probióticos para el hombre también se han evaluado para su utilización en peces (Nikoskelainen *et al.*, 2001b; Nikoskelainen *et al.*, 2003; Panigrahi *et al.*, 2007). En este sentido, una de las cepas más estudiadas como probiótico en peces es *Lb. rhamnosus* ATCC53103 (denominada también *Lb. rhamnosus* GG), que fue aislada de intestino de personas sanas

y que ha demostrado ser efectiva para: (i) la prevención y el tratamiento de la diarrea aguda en niños, originada principalmente por rotavirus, (ii) la prevención de la diarrea del viajero, (iii) el tratamiento de diarrea asociada a terapia con antibióticos, (iv) la prevención y el tratamiento de dermatitis atópica en niños, y (v) la prevención de caries dentales también en niños (Goldin y Gorbach, 2008). En el caso de la trucha arcoíris, Nikoskelainen *et al.* (2001b) observaron que la administración de *Lb. rhamnosus* ATCC53103 (10^9 ufc/g) durante 51 días reducía la mortalidad originada por *A. salmonicida*. Más tarde, Nikoskelainen *et al.* (2003) también mostraron que la administración de distintas concentraciones de esta cepa a trucha arcoíris aumentaba el estallido respiratorio de células sanguíneas (10^4 ufc/g), la actividad del complemento (10^6 ufc/g) y los niveles de inmunoglobulinas (10^4 y 10^8 ufc/g) en el suero. Por otra parte, Panigrahi *et al.* (2007) también mostraron que esta cepa administrada (10^9 ufc/g) durante 45 días en trucha arcoíris aumentaba los transcritos de los genes que codifican la IL-1 β , TNF-1, TNF-2 y TGF- β en el bazo. Chang y Liu (2002) mostraron que la administración de *E. faecium* SF68, empleada como probiótico en humanos para el tratamiento de diarrea, mejoraba las tasas de supervivencia en la anguila infectada con *Ed. tarda*. También se han estudiado cepas aisladas de animales de abasto y alimentos fermentados para su empleo en acuicultura. Wang *et al.* (2008a) observaron que la administración de la cepa *E. faecium* ZJ4, aislada de cerdo, mejoraba los índices de crecimiento e incrementaba el estallido respiratorio de los leucocitos de la sangre y la actividad mieloperoxidasa y la actividad del complemento del suero de tilapias. Por otra parte, Chiu *et al.* (2007) observaron que la administración de *Lb. plantarum* 7-40 (NTU102) (10^7 ufc/g), aislada de repollo en vinagre, incrementaba la actividad peroxidasa y superóxido dismutasa, los transcritos de profenoloxidasa y peroxinectina y la tasa de supervivencia frente a *V. alginolyticus* en el camarón blanco del Pacífico. La administración de la misma cepa (10^8 ufc/g) en el mero de pintas naranjas, mejoró su crecimiento y la tasa de supervivencia frente a los ictiopatógenos *Streptococcus* spp. e iridovirus, aumentó la actividad del complemento, la lisozima y la glutatión peroxidasa e incrementó la actividad fagocítica, el índice fagocítico y el estallido respiratorio de los leucocitos del riñón anterior (Son *et al.*, 2009).

II.4.4.1. *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5 (Bactocell®)

P. acidilactici CNCM MA18/5M (Bactocell®) es el primer y único microorganismo probiótico autorizado para su empleo en acuicultura en la Unión Europea (Reglamento CE N° 911/2009; Reglamento UE N° 95/2013). Esta autorización se basa en el reconocimiento de la seguridad por su estatus QPS, así como en su eficacia sobre la mejora productiva de salmónidos y gambas (Reglamento CE N° 911/2009) y de todos los peces en general (Reglamento UE N° 95/2013). En los salmónidos, esta cepa probiótica mejora la calidad del producto final mediante un aumento del número de individuos con una buena conformación, previniendo el síndrome de compresión de la columna vertebral (SCCV). En el caso de la trucha arcoíris, este síndrome afecta a más del 20% de la

producción, dando lugar a importantes pérdidas económicas para los acuicultores. Además, este probiótico se considera beneficioso para el desarrollo de todos los peces, incrementando la proporción de peces bien formados y reduciendo la deformación ósea. Por otra parte, esta cepa probiótica mejora la supervivencia y el crecimiento de las gambas y aumenta su resistencia frente a infecciones por *Vibrio* spp.

En Europa, los probióticos autorizados para la alimentación animal se clasifican como “aditivos zootécnicos” y están sujetos a evaluaciones realizadas por un comité de científicos expertos, en las que se determinan su composición, calidad, seguridad y eficacia en la especie en estudio. El empleo del probiótico *P. acidilactici* CNCM MA 18/5M fue autorizado sin límite de tiempo para pollos de engorde por el Reglamento (CE) N° 1200/2005 y para cerdos de engorde por el Reglamento (CE) N° 2036/2005; y durante diez años, para salmónidos y gambas por el Reglamento (CE) N° 911/2009, para lechones destetados por el Reglamento (UE) N° 1120/2010, para gallinas ponedoras por el Reglamento (UE) N° 212/2011 y para todos los peces (excepto los salmónidos) por el Reglamento (UE) N° 95/2013. Además, el 6 de mayo de 2013, se autorizó el preparado de *P. acidilactici* CNCM MA 18/5M como aditivo en la alimentación animal para su uso en el agua potable destinada a lechones destetados, cerdos de engorde, gallinas ponedoras y pollos de engorde por el Reglamento (UE) N° 413/2013.

Como se ha descrito anteriormente, esta cepa probiótica fue empleada primero en animales terrestres (pollos y cerdos de engorde) por su efecto positivo en la maduración intestinal, mejora de la digestibilidad y protección frente a bacterias patógenas. Con respecto a su empleo en acuicultura, el primer estudio fue realizado en larvas de abadejo (*Pollachius pollachius*) alimentadas con artemia enriquecida con *P. acidilactici* CNCM MA 18/5M, observándose una mejoría en la ganancia de peso (Gatesoupe, 2002). Sin embargo, estudios realizados en trucha arcoíris (Aubin *et al.*, 2005), tilapia del Nilo (Shelby *et al.*, 2006) y pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Shelby *et al.*, 2007) mostraron que la administración de este probiótico no mejoraba los índices de crecimiento. Uno de los principales beneficios que se han estudiado es la prevención del SCCV en truchas arcoíris después de la administración continua del probiótico durante 5 meses (Aubin *et al.*, 2005). Además, Merrifield *et al.* (2011) observaron que este probiótico colonizaba el intestino de la trucha arcoíris, al menos, durante su suplementación en el pienso, tanto en su forma vegetativa como liofilizada, y reducía el índice K de conformación anatómica, mejorando la apariencia estética de los peces para el consumidor. Sin embargo, en este estudio no se observaron mejorías en la estimulación del sistema inmune de las truchas, al igual que en otros estudios realizados en tilapia del Nilo (Shelby *et al.*, 2006) y pez gato (Shelby *et al.*, 2007). No obstante, Ferguson *et al.* (2010) observaron que este probiótico mejoraba la tasa de supervivencia, la actividad de lisozima en el suero y el número de leucocitos sanguíneos en tilapia del Nilo. En el caso de los estudios realizados en el camarón *Litopenaeus stylirostris*, Castex *et al.* (2008) observaron que la administración de *P. acidilactici* CNCM MA 18/5M mejoraba su supervivencia tras la infección con *V. nigripulchritudo* y también su biomasa. Finalmente, en otro

estudio realizado en la misma especie de camarón se observó que este probiótico disminuía los niveles de los parámetros de estrés oxidativo en los especímenes infectados con el mismo patógeno (Castex *et al.*, 2009).

CAPÍTULO III

**Actividad antimicrobiana, susceptibilidad a antibióticos y factores
de virulencia de bacterias lácticas de origen acuático
para su empleo como probióticos en acuicultura**

CHAPTER III

***Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors
of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use
as probiotics in aquaculture***

BMC Microbiology (2013), 13:15

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture

Estefanía Muñoz-Atienza¹, Beatriz Gómez-Sala¹, Carlos Araújo^{1,2}, Cristina Campanero¹, Rosa del Campo³, Pablo E Hernández¹, Carmen Herranz¹ and Luis M Cintas^{1*}

Abstract

Background: The microorganisms intended for use as probiotics in aquaculture should exert antimicrobial activity and be regarded as safe not only for the aquatic hosts but also for their surrounding environments and humans. The objective of this work was to investigate the antimicrobial/bacteriocin activity against fish pathogens, the antibiotic susceptibility, and the prevalence of virulence factors and detrimental enzymatic activities in 99 Lactic Acid Bacteria (LAB) (59 enterococci and 40 non-enterococci) isolated from aquatic animals regarded as human food.

Results: These LAB displayed a broad antimicrobial/bacteriocin activity against the main Gram-positive and Gram-negative fish pathogens. However, particular safety concerns based on antibiotic resistance and virulence factors were identified in the genus *Enterococcus* (86%) (*Enterococcus faecalis*, 100%; *E. faecium*, 79%). Antibiotic resistance was also found in the genera *Weissella* (60%), *Pediococcus* (44%), *Lactobacillus* (33%), but not in leuconostocs and lactococci. Antibiotic resistance genes were found in 7.5% of the non-enterococci, including the genera *Pediococcus* (12.5%) and *Weissella* (6.7%). One strain of both *Pediococcus pentosaceus* and *Weissella cibaria* carried the erythromycin resistance gene *mef(A/E)*, and another two *P. pentosaceus* strains harboured *Inu(A)* conferring resistance to lincosamides. Gelatinase activity was found in *E. faecalis* and *E. faecium* (71 and 11%, respectively), while a low number of *E. faecalis* (5%) and none *E. faecium* exerted hemolytic activity. None enterococci and non-enterococci showed bile deconjugation and mucin degradation abilities, or other detrimental enzymatic activities.

Conclusions: To our knowledge, this is the first description of *mef(A/E)* in the genera *Pediococcus* and *Weissella*, and *Inu(A)* in the genus *Pediococcus*. The *in vitro* subtractive screening presented in this work constitutes a valuable strategy for the large-scale preliminary selection of putatively safe LAB intended for use as probiotics in aquaculture.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Aquatic animals, Aquaculture probiotics, Anti-fish pathogens activity, Antibiotic resistance and virulence factors, Qualified Presumption of Safety

Background

Aquaculture has the potential to make a significant contribution to the increasing demand for aquatic food in most world regions; however, in order to achieve this goal, the sector will have to face significant challenges,

including the production intensification, the disease control and the prevention of the environmental deterioration [1]. In fish farming, the widespread use of antibiotics as prophylactic and therapeutic agents to control bacterial diseases has been associated with the emergence of antibiotic resistance in bacterial pathogens and with the alteration of the microbiota of the aquaculture environment [2,3]. This resulted in the ban of antibiotic usage as animal growth promoters in Europe and stringent worldwide regulations on therapeutical antibiotic applications. This scenario has led to an evergrowing interest in the search and

* Correspondence: lcintas@vet.ucm.es

¹Grupo de Seguridad y Calidad de los Alimentos por Bacterias Lácticas, Bacteriocinas y Probióticos (Grupo SEGABALBP) Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

development of alternative strategies for disease control, within the frame of good husbandry practices, including adequate hygiene conditions, vaccination programmes and the use of probiotics, prebiotics and immunostimulants [4-6]. Recently, novel strategies to control bacterial infections in aquaculture have emerged, such as specific killing of pathogenic bacteria by bacteriophages, growth inhibition of pathogen by short-chain fatty acids and polyhydroxyalkanoates, and interference with the regulation of virulence genes (quorum sensing disruption), which have been reviewed by Defoirdt et al. [7]. With regard to probiotics, they are defined as live microbial adjuncts which have a beneficial effect on the host by: (i) modifying the host-associated or ambient microbial community; (ii) improving feed use or enhancing its nutritional value; (iii) enhancing the host response towards disease; and/or (iv) improving its environment [8]. To date, most probiotics proposed as biocontrollers and bioremediation agents for aquaculture belong to the LAB group (mainly to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* and *Carnobacterium*), to the genera *Vibrio*, *Bacillus*, and *Pseudomonas* or to the species *Saccharomyces cerevisiae* [8,9]. Recently, a probiotic culture (Bactocell®, *Pediococcus acidilactici* CNCM MA18/5 M) has been authorized for the first time for use in aquaculture in the European Union.

According to the FAO/WHO [10], the development of commercial probiotics requires their unequivocal taxonomic identification, as well as their *in vitro* and *in vivo* functional characterization and safety assessment. In Europe, the European Food Safety Agency (EFSA) proposed a system for a pre-market safety assessment of selected groups of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives leading to a Qualified Presumption of Safety (QPS) status [11-13]. The QPS approach propose that the safety assessment of a defined taxonomic group could be made based on establishing taxonomic identity, body of knowledge, possible pathogenicity and commercial end use. According to the EFSA approach [13], most LAB species are included in the QPS list and, therefore, demonstration of their safety only requires confirmation of the absence of determinants of resistance to antibiotics of human and veterinary clinical significance. However, in the case of enterococci, a more thorough, strain-specific evaluation is required to assess the risk associated to their intentional use in the food chain. In this work, we present the antimicrobial activity against fish pathogens and the *in vitro* safety assessment beyond the QPS approach of a collection of 99 LAB belonging to the genera *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Weissella*, previously isolated from aquatic animals regarded as human food [14] and intended for use as probiotics in aquaculture.

Results

Direct antimicrobial activity of the 99 LAB of aquatic origin

The 99 LAB strains isolated from fish, seafood and fish products displayed direct antimicrobial activity against, at least, four of the eight tested indicator microorganisms (Table 1). The most sensitive indicators were *Listonella anguillarum* CECT4344, *Ls. anguillarum* CECT7199 and *Aeromonas hydrophila* CECT5734, followed by *Lactococcus garvieae* JIP29-99, *Streptococcus iniae* LMG14521 and *Streptococcus agalactiae* CF01173. On the contrary, *Photobacterium damsela* CECT626 and *Vibrio alginolyticus* CECT521 were the less sensitive indicator microorganisms.

Preliminary safety evaluation of enterococci: presence of virulence factors, production of gelatinase and hemolysin and antibiotic susceptibility

Concerning *E. faecalis*, most of the strains (20 strains, 95%) harboured, at least, one relevant virulence factor: *efaAfs* (95%), *gelE* (71%), or *agg* (67%) genes (Table 2). A positive gelatinase reaction was found in 15 *E. faecalis* strains (71%) which harboured *gelE*, from which 12 also harboured *agg* gene. Only one *E. faecalis* strain (*E. faecalis* SDP10) (5%), harbouring *cylL_L*-*cylL_S*-*cylM*, exerted hemolytic activity, while none of the strains amplified *hly* or *esp* genes. With regard to *E. faecium*, 20 strains (53%) harboured, at least, one relevant virulence factor: *efaAfs* (45%), *gelE* (24%) or *agg* (8%), but only 4 strains (11%) exerted gelatinase activity. None of the *E. faecium* strains exerted hemolytic activity nor amplified *hly* or *esp* genes. The results of the antibiotic susceptibility tests revealed that 39 enterococcal strains (66%) displayed acquired antibiotic resistance to antibiotics other than penicillin G, chloramphenicol and high-level gentamicin. In this respect, 13 *E. faecalis* strains (62%) showed acquired resistance to (i) second generation quinolones (ciprofloxacin and/or norfloxacin) (12 strains, 57%), (ii) rifampicin (5 strains, 24%), (iii) nitrofurantoin (5 strains, 24%), (iv) glycopeptides (vancomycin and teicoplanin) (4 strains, 19%), and/or (v) erythromycin (1 strain, 5%). However, 26 *E. faecium* strains (68%), including 17 strains that encode virulence factors and nine strains without these traits, displayed acquired resistance to (i) erythromycin (14 strains, 37%), (ii) nitrofurantoin (11 strains, 29%), (iii) second generation quinolones (ciprofloxacin and/or norfloxacin) (10 strains, 26%), (iv) rifampicin (4 strains, 11%), (v) tetracycline (2 strains, 5%), and/or (vi) glycopeptides (vancomycin and teicoplanin) (1 strain, 3%). Moreover, multiple antibiotic resistance (two to six antibiotics) was found in *E. faecalis* (10 strains, 48%) and, to a lesser extent, in *E. faecium* (12 strains, 32%) (Table 2). According to the results above, 21 *E. faecalis* strains were discarded for further studies based on the presence of virulence factors (8 strains,

Table 1 Origin and direct antimicrobial activity against fish pathogens of LAB isolated from aquatic animals

Origin	Strain		Indicator microorganisms ^a							
			<i>Lactococcus garvieae</i> JIP29-99	<i>Streptococcus agalactiae</i> CF01173	<i>Streptococcus iniae</i> LMG14521	<i>Aeromonas hydrophila</i> CECT5734	<i>Listonella anguillarum</i> CECT4344	<i>Ls. anguillarum</i> CECT7199	<i>Photobacterium damsela</i> CECT626	<i>Vibrio alginolyticus</i> CECT521
Albacore (<i>Thunnus alalunga</i>)	<i>Enterococcus faecium</i>	BNM58	+	+	+	++	++	+++	+	-
	<i>Weissella cibaria</i>	BNM69	+	+	+	+++	+++	+++	-	-
Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	<i>Enterococcus faecalis</i>	SMF10	+	+	+	++	+++	++	-	+
		SMF28	+	+	++	++	+++	+	-	+
		SMF37	+	+	+	+	++	+++	-	+
		SMF69	+	+	++	++	+++	+++	+	+
		SMM67	+	+	++	++	+++	+++	-	-
		SMM70	+	+	+	+	+++	+++	-	-
	<i>E. faecium</i>	SMA1	+	+	+	++	++	+++	+	-
		SMA7	+	+	+	+	++	+++	+	+
		SMA8	+	+	+	++	++	+++	+	+
		SMA101	+	+	+	++	+++	++	+	+
		SMA102	+	+	+	++	+++	+	+	+
		SMA310	++	+	+	++	+++	++	+	+
		SMA320	++	+	+	++	++	+++	+	+
		SMA361	+	+	+	++	++	+++	+	+
		SMA362	+	+	+	++	++	+++	+	-
		SMA384	+	+	+	++	++	+++	+	-
		SMA389	+	+	+	++	++	+++	-	+
		SMF8	+	+	++	++	++	++	+	-
		SMF39	+	+	++	++	++	+++	+	+
	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i> (<i>Lb. carneus</i>)	SMA17	+	-	+	++	+++	+++	-	-
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (<i>L. cremoris</i>)	SMF110	+	+	+	+	+++	+++	+	+
		SMF161	+	+	+	++	+++	+++	+	++
		SMF166	+	+	+	++	++	+++	+	++
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> (<i>Lc. cremoris</i>)	SMM69	+	+	+	++	+++	+++	-	-

Table 1 Origin and direct antimicrobial activity against fish pathogens of LAB isolated from aquatic animals (Continued)

Estefanía Muñoz-Atienza	100	Cod (<i>Gadus morhua</i>)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	SMF120	++	++	++	++	+++	+++	-	+
				SMF130	++	+	++	++	+++	+++	-	+
				SMM73	++	+	+	+++	+++	+++	+	++
			<i>W. cibaria</i>	SMA14	++	+	+	++	+++	+++	+	++
				SMA25	+	+	+	+++	+++	+++	-	-
			<i>E. faecalis</i>	BCS27	++	++	++	++	+++	+++	-	-
				BCS32	+	+	+	+	++	+++	-	+
				BCS53	+	++	+	+	+++	+++	+	-
				BCS67	+	+	-	++	+++	++	-	+
				BCS72	+	+	+	++	+++	+++	+	-
				BCS92	+	+	+	++	+++	++	+	+
		<i>E. faecium</i>		BCS59	++	+	++	++	+++	+++	-	+
				BCS971	+	+	+	+	+++	+++	-	+
				BCS972	+	+	+	+	+++	+++	-	+
		<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> (Lb. <i>curvatus</i>)		BCS35	-	-	+	++	+++	+++	-	-
			<i>Lc. cremoris</i>	BCS251	+	+	++	+	+++	+++	-	+
				BCS252	+	+	++	+	+++	+++	-	+
		<i>P. pentosaceus</i>		BCS46	++	+	++	+++	+++	+++	-	+
		<i>W. cibaria</i>		BCS50	++	+	++	++	+++	+++	-	+
		Common cockle (<i>Cerastoderma edule</i>)	<i>E. faecium</i>	B13	+	+	++	++	+++	+++	-	-
				B27	+	+	+	++	+++	++	+	+
			<i>Lb. carnosus</i>	B43	+	+	+	++	+++	+++	-	-
			<i>P. pentosaceus</i>	B5	++	+	++	++	+++	+++	-	-
				B11	++	+	++	+++	+++	+++	+	-
				B41	++	++	++	+++	+++	+++	+	++
				B260	++	+	++	++	+++	+++	-	++
			<i>W. cibaria</i>	B4620	++	+	++	++	+++	+++	-	++
		Common ling (<i>Molva molva</i>)	<i>E. faecium</i>	MV5	+	+	+	++	++	+++	+	+
			<i>E. faecalis</i>	P77	++	+	++	++	+++	+++	-	+

Table 1 Origin and direct antimicrobial activity against fish pathogens of LAB isolated from aquatic animals (Continued)

101	Estefanía Muñoz-Atienza	<i>E. faecium</i>	P68	++	+	+++	++	+++	+++	-	+
			P623	+	+	+	+	+++	++	-	+
		<i>P. pentosaceus</i>	P63	++	+	++	+++	+++	+++	-	+
			P621	++	+	++	+	+++	+++	-	+
		<i>W. cibaria</i>	P38	++	++	++	++	+++	+++	-	+
			P50	++	+	+	++	+++	+++	-	+
			P61	++	+	+	++	+++	+++	-	-
			P64	++	+	+	+++	+++	+++	+	++
			P69	++	+	+	++	+++	+++	+	++
			P71	+	+	++	++	+++	+++	+	+
			P73	++	++	++	++	+++	+++	-	+
			P622	++	++	++	+	+++	+++	+	+
		European seabass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	LPP29	+	+	+	+	++	+++	+	-
			<i>P. pentosaceus</i>	LPM78	++	+	++	++	+++	+++	-
				LPM83	++	+	++	++	+++	+++	-
				LPP32	++	++	++	++	+++	+++	-
				LPV46	++	+	++	++	+++	+++	-
		European squid (<i>Loligo vulgaris</i>)	LPV57	++	+	++	+++	+++	+++	-	-
			<i>E. faecium</i>	CV1	+	+	+	+++	+++	-	+
				CV2	++	+	+	+++	++	+	+
		Megrim (<i>Lepidorhombus boscii</i>)	<i>E. faecalis</i>	GM22	-	-	+	++	+++	+	++
				GM26	-	-	+	+	++	+	-
			<i>E. faecium</i>	GM33	-	-	++	+	++	+++	-
				GM23	+	+	+	++	++	+++	+
				GM29	++	++	+	++	++	+++	+
		Norway lobster (<i>Nephrops norvegicus</i>)	<i>E. faecalis</i>	GM351	-	-	+	+	++	++	-
				GM352	++	+	+	++	++	+++	+
				CGM16	++	+	++	++	+++	+++	-
				CGM156	+	+	++	++	+++	+++	-

Table 1 Origin and direct antimicrobial activity against fish pathogens of LAB isolated from aquatic animals (Continued)

Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>E. faecium</i>	CGM1514	+	+	+	++	+++	++	+	+
		CGV67	++	+	+	+	+++	+++	+	+
		CGM171	+	+	+	+	+++	+++	+	+
		CGM172	+	+	+	+	+++	+++	+	+
		TPM76	+	+	+	+	++	+++	+	+
Sardine (<i>Sardina pilchardus</i>)	<i>P. pentosaceus</i>	TPP2	+	+	+	+	++	+++	+	+
		TPP3	++	+	+	++	+++	+++	-	++
	<i>E. faecalis</i>	SDP10	+	+	+	+	+++	+++	-	+
Swimcrab (<i>Necora puber</i>)	<i>E. faecium</i>	<i>W. cibaria</i>	SDM381	++	+	++	++	+++	+++	-
		SDM389	+	+	++	++	+++	+++	-	-
		NV50	+	+	+	++	++	++	+	-
		NV51	++	+	+	+	++	++	+	++
		NV52	++	+	+	+	++	+++	+	+
		NV54	++	+	+	+	++	+++	+	+
		NV56	++	+	+	++	++	++	+	-

^aDirect antimicrobial activity was determined by a SOAT and the scores reflect different degrees of growth inhibition (diameter in mm); -, no inhibition; +, 3–5 mm inhibition zone; ++, 6–9 mm inhibition zone; +++, ≥10 mm inhibition zone.

Table 2 Preliminary safety evaluation of enterococci

Enterococcus spp.	Strain	Virulence Factors		Antibiotic resistance phenotype ^c
		Genotype ^a	Phenotype ^b	
<i>E. faecalis</i>	SMF10	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, NOR
	SMF28	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, NOR
	SMF37	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	SMF69	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, RIF
	SMM67	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, NIT, NOR, TEC, VAN
	SMM70	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	ERY, NIT
	BCS27	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, NIT, NOR, RIF, TEC, VAN
	BCS32	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	NOR
	BCS53	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	BCS67	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP
	BCS72	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	BCS92	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	P77	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	NIT, NOR, RIF, TEC, VAN
	GM22	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, NOR
	GM26	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	GM33	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	CGM156	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, NIT, NOR, RIF, TEC, VAN
	CGM1514	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	CGM16	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, NOR, RIF
	CGV16	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	NOR
	SDP10	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺ , <i>cylL</i> _{L5} ⁺ , <i>cylL</i> _{L5} <i>M</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁺	-
<i>E. faecium</i>	BNM58	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	SMA1	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP
	SMA7	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	SMA8	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	SMA101	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	ERY, NIT
	SMA102	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	ERY, NIT
	SMA310	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	ERY, NIT
	SMA320	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	ERY, NIT
	SMA361	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	ERY
	SMA362	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	ERY, NIT
	SMA384	<i>gelE</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	NIT
	SMA389	<i>gelE</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, NIT, NOR
	SMF8	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	SMF39	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	-
	BCS59	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	NIT
	BCS971	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	ERY
	BCS972	n.d.	GelE ⁺ , Hly ⁻	ERY
	B13	<i>gelE</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP
	B27	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP
	MV5	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, NIT
	P68	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>cylL</i> _{L5} ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, NIT, NOR, RIF, TEC, VAN
	P623	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	ERY

Table 2 Preliminary safety evaluation of enterococci (Continued)

LPP29	n.d.	GelE ⁻ , Hly ⁻	-
CV1	n.d.	GelE ⁻ , Hly ⁻	-
CV2	n.d.	GelE ⁻ , Hly ⁻	-
GM23	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁻ , Hly ⁻	CIP, NOR, RIF, TET
GM29	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>cylL</i> ₅ ⁺	GelE ⁻ , Hly ⁻	CIP, NOR, RIF
GM351	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>gelE</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁺ , Hly ⁻	CIP, NOR
GM352	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁻ , Hly ⁻	CIP, NIT, NOR, RIF, TET
CGM171	n.d.	GelE ⁻ , Hly ⁻	ERY
CGM172	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁻ , Hly ⁻	ERY
TPM76	n.d.	GelE ⁻ , Hly ⁻	-
TPP2	n.d.	GelE ⁻ , Hly ⁻	-
NV50	<i>efaAfs</i> ⁺ , <i>agg</i> ⁺	GelE ⁻ , Hly ⁻	-
NV51	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁻ , Hly ⁻	ERY
NV52	n.d.	GelE ⁻ , Hly ⁻	ERY
NV54	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁻ , Hly ⁻	ERY
NV56	<i>efaAfs</i> ⁺	GelE ⁻ , Hly ⁻	-

^an.d., not detected.

^bGelE and Hly refer to gelatinase and cytolysin/hemolysin activity, respectively.

^cAbbreviation of antibiotics: CIP, ciprofloxacin; ERY, erythromycin; NIT, nitrofurantoin; NOR, norfloxacin; RIF, rifampicin; TEC, teicoplanin; TET, tetracycline; VAN, vancomycin.

38%), acquired antibiotic resistance (1 strain, 5%) or both (12 strains, 57%). Regarding *E. faecium* strains, 29 (76%) were dropped from further screening based on acquired antibiotic resistance (9 strains, 24%), the presence of virulence factors (3 strains, 8%) or both (17 strains, 45%).

Extracellular antimicrobial activity of the 49 pre-selected LAB

The antimicrobial activity of supernatants from the 49 pre-selected LAB (9 *E. faecium* selected based on their preliminary safety assessment and 40 non-enterococcal strains) with direct antimicrobial activity against fish pathogens was assayed against three indicator microorganisms by an ADT (Table 3). In this regard, 24 (49%) and 10 (20%) strains displayed extracellular antimicrobial activity in their supernatants and/or 20-fold concentrated supernatants against *Pediococcus damnosus* CECT4797 and *L. garvieae* JIP 29–99, respectively, but none of the strains inhibited the Gram-negative strain *A. hydrophila* CECT5734. Interestingly, the antimicrobial activity of the respective supernatants was sensitive to proteinase K treatment, but was not affected by the heat treatment, revealing the proteinaceous nature and heat stability of the secreted antimicrobial compounds (i.e., heat-stable bacteriocins). The 24 LAB strains secreting bacteriocins into the liquid growth medium belong to the species *P. pentosaceus* (15 strains), *E. faecium* (8 strains), and *Lb. curvatus* (1 strain).

In vitro safety assessment of the 49 pre-selected LAB

The 49 pre-selected LAB were further submitted to a comprehensive safety assessment by different *in vitro* tests.

Hemolysin production, bile salts deconjugation and mucin degradation

None of the non-enterococcal strains showed hemolytic activity, similarly as found for the 9 enterococci. Moreover, bile salts deconjugation and mucin degradation abilities were not found in any of the tested strains.

Enzymatic activities

The results of the analysis of enzymatic activity profiles of the tested LAB are shown in Table 4. None of the strains showed lipolytic activity, except *E. faecium* LPP29, TPM76, SMA7, and SMF8 which produced esterase (C4) and esterase lipase (C8). Moreover, none of the LAB strains showed protease activity (trypsin and α-chymotrypsin). Nevertheless, peptidase activity (leucine, valine or cystine arylamidase) was found in all the species. All strains showed acid phosphatase (except *E. faecium* TPM76 and *Lc. cremoris*) and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase activities, but none displayed alkaline phosphatase activity. β-Galactosidase was found in most species (but not in all strains) except *Lb. curvatus* and *L. cremoris*. However, α-glucosidase was only found in the three *Lc. cremoris* strains. β-Glucosidase and N-acetyl-β-glucosaminidase activities were observed in most *E. faecium*, *Lactobacillus* spp., *L. cremoris*, and *P. pentosaceus* strains, but only in two *W. cibaria* strains, while the three *Lc. cremoris* strains showed β-glucosidase but lacked N-acetyl-β-glucosaminidase activity. On the other hand, α-galactosidase, β-glucuronidase, α-mannosidase, and

Table 3 Extracellular antimicrobial activity of the 49 pre-selected LAB^a

LAB species ^b	Strain	Indicator microorganisms					
		<i>P. damnosus</i> CECT4797		<i>L. garvieae</i> JIP29-99		<i>A. hydrophila</i> CECT5734	
		S	CS	S	CS	S	CS
Enterococci							
<i>E. faecium</i>	BNM58	22.4	26.8	14.0	15.0	-	-
	SMA7	-	-	-	-	-	-
	SMA8	19.0	19.6	9.4	10.2	-	-
	SMF8	19.0	21.8	10.3	10.8	-	-
	LPP29	20.5	24.4	12.6	13.1	-	-
	CV1	15.0	19.2	-	-	-	-
	CV2	19.8	23.7	12.7	11.4	-	-
	TPM76	17.0	21.2	-	8.7	-	-
	TPP2	19.7	23.5	12.8	12.4	-	-
Non-enterococci							
<i>Lb. curvatus</i>	BCS35	18.2	24.7	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i>	SMF120	-	-	-	-	-	-
	SMF130	7.4	9.7	-	-	-	-
	SMM73	-	9.5	-	-	-	-
	BCS46	-	9.4	-	-	-	-
	B5	8.1	9.0	-	-	-	-
	B11	-	9.0	-	-	-	-
	B41	7.3	11.7	-	-	-	-
	B260	7.3	10.6	-	-	-	-
	P63	-	9.8	-	-	-	-
	P621	-	10.5	-	-	-	-
	LPM78	-	8.3	-	-	-	-
	LPM83	7.9	11.0	-	-	-	-
	LPP32	8.5	11.3	-	8.9	-	-
	LPV46	8.2	11.3	-	8.2	-	-
	LPV57	7.6	10.5	-	-	-	-
	TPP3	9.0	11.7	7.5	9.2	-	-

^aAntimicrobial activity (mm) of supernatants (S) and 20-fold concentrated supernatants (CS) as determined by an ADT.

^b*Lb. carnosus*, *L. cremoris*, *Lc. cremoris* and *W. cibaria* strains did not show extracellular antimicrobial activity against any of the tested indicator microorganisms.

α -fucosidase activities were not detected in any of the tested LAB strains.

Antibiotic susceptibility determined by the broth microdilution test

The distribution of MICs of the tested antibiotics is summarized in Tables 5 and 6. Microbiological breakpoints for ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, and chloramphenicol reported by the FEEDAP document on the assessment of bacterial products used as feed additives in relation to antibiotic resistance [15] were used to categorise the 49 LAB as susceptible or resistant strains. In this document, the genus *Weissella*, which is considered a

group of heterofermentative *Leuconostoc*-like LAB [16], is not included. For this reason, the respective MICs were interpreted by using the breakpoints given for the genus *Leuconostoc*. Besides, due to the lack of microbiological breakpoints for penicillin and linezolid on the FEEDAP document, we interpreted our results on these antibiotics according to the cut-off levels proposed by Klare *et al.* [17] for pediococci, namely 1 and 2 mg/L for penicillin and linezolid, respectively. According to our results, the percentages of strains showing antibiotic resistance in the genera *Weissella*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* and *Enterococcus* were 60, 44, 33 and 11%, respectively, while none of the leuconostocs and lactococci showed this phenotype. In summary, 97.5% of the 40 non-enterococcal

Table 4 Enzymatic activity profiles of the 49 pre-selected LAB^a

Species	Strain	Esterase (C4)	Esterase lipase (C8)	Leucine arylamidase	Valine arylamidase	Cystine arylamidase	Acid phosphatase	Naphthol-AS- BI- phosphohydrolase	β- Galactosidase	α- Glucosidase	β- Glucosidase	N-acetyl- β- glucosaminidase
Enterococci												
<i>E. faecium</i>	BNM58	0	0	≥40	10	10	20	10	0	0	0	0
	SMA7	20	20	≥40	30	20	30	10	0	0	0	0
	SMA8	0	0	≥40	≥40	5	5	5	5	0	20	≥40
	SMF8	5	5	10	5	5	20	10	0	0	30	0
	LPP29	10	10	30	5	20	10	10	0	0	0	0
	CV1	0	0	≥40	≥40	5	10	20	20	0	30	≥40
	CV2	0	0	≥40	≥40	10	10	20	0	0	10	≥40
	TPM76	30	10	20	0	0	0	10	10	0	0	0
	TPP2	0	0	≥40	20	10	10	10	5	0	30	0
Non-enterococci												
<i>Lb. carnosus</i>	SMA17	0	0	≥40	≥40	0	30	20	30	0	30	30
	B43	0	0	≥40	≥40	0	5	5	10	0	0	0
<i>Lb. curvatus</i>	BCS35	0	0	≥40	10	5	10	20	0	0	5	10
<i>L. cremoris</i>	SMF110	0	0	≥40	≥40	0	20	20	0	0	30	30
	SMF161	0	0	20	0	5	≥40	20	0	0	0	0
	SMF166	0	0	≥40	≥40	0	20	20	0	0	10	10
<i>Lc. cremoris</i>	SMM69	0	0	10	0	0	0	10	≥40	30	≥40	0
	BCS251	0	0	5	0	0	0	5	20	20	10	0
	BCS252	0	0	10	0	0	0	10	30	20	10	0
<i>P. pentosaceus</i>	SMF120	0	0	≥40	≥40	20	≥40	≥40	0	0	20	20
	SMF130	0	0	≥40	≥40	20	30	≥40	20	0	≥40	≥40
	SMM73	0	0	≥40	30	10	20	30	20	0	30	≥40
	BCS46	0	0	≥40	≥40	5	20	30	30	0	≥40	≥40
	B5	0	0	30	≥40	10	10	20	10	0	30	≥40
	B11	0	0	≥40	30	0	5	20	0	0	30	≥40
	B41	0	0	30	≥40	0	5	20	5	0	20	≥40
	B260	0	0	≥40	≥40	10	20	30	0	0	20	30
	P63	0	0	≥40	≥40	5	20	20	30	0	30	≥40
	P621	0	0	≥40	≥40	0	5	30	0	0	30	≥40
	LPM78	0	0	30	30	5	10	20	20	0	30	≥40

Table 4 Enzymatic activity profiles of the 49 pre-selected LAB^a (Continued)

<i>W. cibaria</i>	LPM83	0	0	30	30	5	10	20	30	0	10	≥40
	LPP32	0	0	≥40	≥40	5	5	20	0	0	30	≥40
	LPV46	0	0	≥40	≥40	5	20	30	5	0	30	30
	LPV57	0	0	≥40	≥40	5	20	30	30	0	≥40	≥40
	TPP3	0	0	≥40	≥40	5	5	5	10	0	0	0
	BNM69	0	0	0	0	0	30	10	30	0	0	0
	SMA14	0	0	0	0	0	20	5	10	0	0	0
	SMA25	0	0	≥40	≥40	0	30	20	≥40	0	30	30
	BCS50	0	0	0	0	0	30	20	30	0	0	0
	B4620	0	0	20	20	0	30	20	30	0	5	5
	P38	0	0	0	0	0	≥40	20	≥40	0	0	0
	P50	0	0	0	0	0	≥40	20	0	0	0	0
	P61	0	0	0	0	0	20	10	0	0	0	0
	P64	0	0	0	0	0	30	10	0	0	0	0
	P69	0	0	0	0	0	≥40	20	≥40	0	0	0
	P71	0	0	0	0	0	≥40	10	0	0	0	0
	P73	0	0	0	0	0	30	20	30	0	0	0
	P622	0	0	0	0	0	≥40	10	0	0	0	0
	SDM381	0	0	10	5	0	20	10	30	0	0	0
	SDM389	0	0	0	0	0	≥40	20	≥40	0	0	0

^aEnzymatic activities determined by an APIZYM test. Relative activity between 0 and ≥ 40 nmol.

strains resulted susceptible to ampicillin, 100% to gentamicin, 72.5% to kanamycin, 100% to streptomycin, 95% to erythromycin, 87.5% to clindamycin, 95% to tetracycline, and 100% to chloramphenicol. For vancomycin, it is known that facultative and obligate heterofermentative *Lactobacillus*, *Pediococcus* spp. and *Leuconostoc* spp. are intrinsically resistant. In contrast, the three lactococci were clearly susceptible to these antibiotics, showing a MIC of 0.5 mg/L. On the other hand, according to the cut-off values proposed by Klare et al. [17], 93% of *P. pentosaceus* strains were susceptible to penicillin and linezolid. With regard to *E. faecium*, all the tested strains were susceptible to ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, chloramphenicol, and erythromycin except *E. faecium* BNM58 against the latter antibiotic (MIC = 8 mg/L). Moreover, multiple antibiotic resistance (three antibiotics) was only detected in *P. pentosaceus* LPM78 (6.2%) and *W. cibaria* SMA25 (6.7%).

Detection of antibiotic resistance genes

The non-enterococcal strains showing antibiotic resistances in the VetMIC assays (17 strains) were further submitted to PCR in order to identify the presence of the respective antibiotic resistance genes. The tested strains were the following: *Lb. carnosus* B43 (ampicillin resistant), *P. pentosaceus* TPP3 and SMF120 (tetracycline resistant), *P. pentosaceus* LPP32, LPM83 and B5 (clindamycin resistant), *P. pentosaceus* LPV57 and *W. cibaria* P50, P61, P64, P73, SDM381, SDM389, SMA14 and BCS50 (kanamycin resistant), and *P. pentosaceus* LPM78 and *W. cibaria* SMA25 (kanamycin, erythromycin and clindamycin resistant). Acquired antibiotic resistances likely due to added genes were only found in strains within the genera *Pediococcus* (12.5%) and *Weissella* (6.7%). The genes involved in the horizontal transfer of resistance to tetracycline [*tet*(K), *tet*(L) and *tet*

(M)], kanamycin [*aac*(6')-Ie-aph(2'')-Ia] and erythromycin [*erm*(A), *erm*(B) and *erm*(C)] were not detected. However, *P. pentosaceus* LPM78 and *W. cibaria* SMA25 harboured the erythromycin resistance gene *mef*(A/E). The obtained amplicons were sequenced and found to have 99% homology with the macrolide-efflux protein (*mefE*) gene described for *Streptococcus pneumoniae* and other *Streptococcus* spp. Moreover, *P. pentosaceus* LPM78 and LPM83 harboured the *lnu*(A) gene encoding the lincomamide O-nucleotidyltransferase that inactivates lincomycin and clindamycin. Sequencing of both amplicons showed 97% and 93% homology with lincomamide nucleotidyltransferase [*lnu*(A)] gene described for *Staphylococcus haemolyticus* and *S. aureus*, respectively. Nevertheless, *lnu*(B) was not detected in any of the tested strains. With regard to *E. faecium* BNM58, which was phenotypically resistant to erythromycin, none of the respective genes [*erm*(A), *erm*(B), *erm*(C) and *mef*(A/E)] were detected.

Discussion

In this work, the antimicrobial activity against fish pathogens and the *in vitro* safety of 99 LAB previously isolated from fish, seafood and fish products [14] have been assayed by using microbiological, biochemical and genetic assays in order to identify and select the most suitable candidates to be further evaluated as probiotics for a sustainable aquaculture. LAB are widely known for their ability to inhibit bacterial pathogens by the production of antimicrobial compounds such as organic acids, oxygen peroxide and ribosomally-synthesized peptides referred to as bacteriocins, which constitutes a desirable property for probiotics and a sustainable alternative to antibiotics [9,18]. In this respect, most of the LAB of aquatic origin tested in this work displayed a broad antimicrobial spectrum against the main Gram-positive and

Table 5 MICs distribution of 10 antibiotics for the 9 enterococcal strains

Antibiotics	Number of strains with the indicated MIC (mg/L) ^a															EFSA breakpoints (mg/L) ^b	
	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		2048
Ampicillin			5	3	1												2
Vancomycin				9													4
Gentamicin					4		5										32
Kanamycin								1		2	4	2					1024
Streptomycin							1		3	5							128
Erythromycin			5				3	1									4
Tetracycline					9												4
Chloramphenicol							8	1									16
Linezolid						9											n.a.
Narasin			1	8													n.a.

^aMICs determined by a VetMIC test. The antibiotic dilution ranges were: 0.25-32 mg/L (ampicillin), 1-128 mg/L (vancomycin), 2-256 mg/L (gentamicin), 16-2048 mg/L (kanamycin), 8-1024 mg/L (streptomycin), 0.5-64 mg/L (erythromycin, tetracycline and chloramphenicol), 0.25-16 mg/L (linezolid) and 0.12-16 (narasin). MICs which exceeded the upper or lower limit of the tested range are listed in the next dilution series. MICs higher than the EFSA breakpoints are indicated in bold.

^bLAB with MICs higher than the EFSA breakpoints are considered as resistant strains [15]. n.a., not available.

Table 6 MICs distribution of 15 antibiotics for the 40 non-enterococcal strains

Antibiotics	Species (no. of tested isolates)	Number of strains with the indicated MIC (mg/L) ^a															EFSA breakpoints (mg/L) ^b
		0.016	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
Ampicillin	<i>Lb. carnosus</i> (2)									1	1						4
	<i>Lb. curvatus</i> (1)						1										4
	<i>L. cremoris</i> (3)				1	2											2
	<i>Lc. cremoris</i> (3)				1	2											2
	<i>P. pentosaceus</i> (16)								15	1							4
	<i>W. cibaria</i> (15)						15										n.a.
Vancomycin	<i>Lb. carnosus</i> (2)										2						n.r.
	<i>Lb. curvatus</i> (1)											1					n.r.
	<i>L. cremoris</i> (3)					3											4
	<i>Lc. cremoris</i> (3)														3		n.r.
	<i>P. pentosaceus</i> (16)														16		n.r.
	<i>W. cibaria</i> (15)														15		n.a.
Gentamicin	<i>Lb. carnosus</i> (2)						1	1									16
	<i>Lb. curvatus</i> (1)									1							16
	<i>L. cremoris</i> (3)				3												32
	<i>Lc. cremoris</i> (3)				3												16
	<i>P. pentosaceus</i> (16)				1			1	9	3	2						16
	<i>W. cibaria</i> (15)				6			7	1		1						n.a.
Kanamycin	<i>Lb. carnosus</i> (2)							1		1							64
	<i>Lb. curvatus</i> (1)											1					64
	<i>L. cremoris</i> (3)							2	1								64
	<i>Lc. cremoris</i> (3)									1	2						16
	<i>P. pentosaceus</i> (16)									1				13	2		64
	<i>W. cibaria</i> (15)									1	1	4	4	4	1		n.a.
Streptomycin	<i>Lb. carnosus</i> (2)									1		1					64
	<i>Lb. curvatus</i> (1)												1				64
	<i>L. cremoris</i> (3)									2	1						32
	<i>Lc. cremoris</i> (3)									1	2						64
	<i>P. pentosaceus</i> (16)										1	5	10				64
	<i>W. cibaria</i> (15)									2		7	5	1			n.a.
Erythromycin	<i>Lb. carnosus</i> (2)				2												1
	<i>Lb. curvatus</i> (1)				1												1
	<i>L. cremoris</i> (3)			2	1												1
	<i>Lc. cremoris</i> (3)			1	2												1
	<i>P. pentosaceus</i> (16)			1	4	7		3			1						1
	<i>W. cibaria</i> (15)					9	5			1							n.a.
Clindamycin	<i>Lb. carnosus</i> (2)		1		1												1
	<i>Lb. curvatus</i> (1)	1															1
	<i>L. cremoris</i> (3)	2			1												1

[illegible]

Trimethoprim	<i>Lb. curvatus</i> (1)	1							n.a.
	<i>L. cremoris</i> (3)				1	2			n.a.
	<i>Lc. cremoris</i> (3)		1	2					n.a.
	<i>P. pentosaceus</i> (16)			2	13	1			n.a.
	<i>W. cibaria</i> (15)				12	3			n.a.
	<i>Lb. carnosus</i> (2)					1		1	n.a.
	<i>Lb. curvatus</i> (1)				1				n.a.
	<i>L. cremoris</i> (3)							3	n.a.
	<i>Lc. cremoris</i> (3)			1	2				n.a.
	<i>P. pentosaceus</i> (16)				8	8			n.a.
	<i>W. cibaria</i> (15)						15		n.a.

^bLAB with MICs higher than the EFSA breakpoints are considered as resistant strains [15]. n.r., not required; n.a., not available.

The application of probiotics in aquaculture may modify the microbial ecology of the aquatic hosts and their surrounding environment, and thus the assessment of their safety to the target aquatic species, the environment and humans constitutes an essential issue [24]. To date, several studies describing the screening and evaluation of LAB as probiotic candidates for aquaculture have been reported [25-28]; however, the safety assessment of the strains is generally limited to *in vivo* challenge tests and rearing trials in order to confirm their lack of toxicity to the aquatic hosts [24,25,28-31]. Strikingly, *in vitro* safety assessment studies have not been generally addressed, despite they have lower economic and ethic costs and result very effective to evaluate the safety of a high number of candidate probiotic strains not only for the host species, but also for humans and the environment. According to EFSA [13], most of the LAB species tested in this work (*P. pentosaceus*, *Lb.*

Our results show that enterococcal virulence factors were more frequently found in *E. faecalis* than in *E. faecium*, which is in concordance with previous reports [32-34]. In this respect, most of the *E. faecalis* (95%) and a large percentage of the *E. faecium* (53%) strains evaluated in this work showed, at least, one virulence factor, being *efaAfs*, *gelE* and *agg* the most frequently detected genes. With regard to *gelE*, which encodes for an extracellular zinc endopeptidase that hydrolyzes gelatin, collagen, hemoglobin, and other bioactive compounds, this gene was detected at high frequency in *E. faecalis*, with all the *gelE*⁺ strains showing gelatinase activity. However, five out of nine *E. faecium* strains harbouring *gelE* were unable to degrade gelatin, suggesting the carriage of a non-functional gene, as previously reported [32,33]. Likewise, in the case of *E. faecium* P68 and *E. faecium* GM29 harbouring *cylL_L*-*cylL_S*, the lack of hemolytic activity may be explained by the absence of *cylM*, whose product is involved in the post-translational modification of cytolysin. On the other hand, *esp* and *hyl*, which encode a cell wall-associated protein involved in immune evasion and an hyaluronidase enzyme, respectively, were not found in any of the tested LAB. Previous studies have reported that *esp* and *hyl* are more common in ampicillin-resistant/vancomycin-resistant *E. faecium* (VREF) than in ampicillin-susceptible/VREF

strains [35]. In this context, the increase in the incidence of VREF at hospital settings has been attributed mainly to the spread of ampicillin-resistant VREF exhibiting *esp* and/or *hyl* [36,37]. Therefore, the fact that the *E. faecium* strains evaluated in this work lack these genes might be related with their non-clinical origin and absence of ampicillin resistance.

The use and frequent overuse of antibiotics, including those used in human medicine, in fish farming has resulted in the emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria in the aquaculture environment. This possesses a threat to human and animal health due to the increase of acquired antibiotic resistance in fish pathogens, the transfer of their genetic determinants to bacteria of terrestrial animals and to human pathogens, and the alterations of the bacterial microbiota of the aquatic environment [11,29]. In our study, the percentage of enterococcal strains showing acquired antibiotic resistance was 68%. Interestingly, the results found in *E. faecium* (71%) and *E. faecalis* (62%) were similar, however, higher percentages of resistance to ciprofloxacin and/or norfloxacin, rifampicin, and glycopeptides were observed in *E. faecalis*. Nevertheless, the occurrence of erythromycin and tetracycline resistance was frequently detected amongst *E. faecium* (45%) but only in one *E. faecalis* strain (5%). In spite of the high prevalence of acquired antibiotic resistance found in enterococci of aquatic origin, they showed low incidence or absence of resistance to the clinically relevant antibiotics vancomycin (8.5%) and ampicillin, penicillin and gentamicin, respectively, which is in agreement with previous studies [33,38]. Moreover, the percentages of strains showing antibiotic resistance in the genera *Weissella*, *Pediococcus* and *Lactobacillus* were 60, 44 and 33%, respectively, while none of the leuconostocs and lactococci showed this phenotype. In this regard, our results indicate that the LAB susceptibility patterns of MIC values to clinically relevant antibiotics are species-dependent, similarly as previously described by other authors [39,40]. Moreover, multiple antibiotic resistance was commonly found in strains within the genus *Enterococcus* (37%), mainly in *E. faecalis*, while being very infrequent in the non-enterococcal strains (5%).

According to EFSA [29], the determination of MICs above the established breakpoint levels, for one or more antibiotic, requires further investigation to make the distinction between added genes (genes acquired by the bacteria via gain of exogenous DNA) or to the mutation of indigenous genes. According to our results, acquired antibiotic resistance likely due to added genes is not a common feature amongst the non-enterococcal LAB of aquatic origin (7.5%). In this respect, this genotype was only found in the genera *Pediococcus* (12.5%) and *Weissella* (6.7%). Although *P. pentosaceus* LPV57 and LPM78 showed resistance to kanamycin (MIC of 128 mg/L), the

respective resistance gene [*aac*(6')-*Ie-aph*(2'')-*Ia*] was not found in these strains. Similarly, *P. pentosaceus* TPP3 and SMF120 were phenotypically resistant to tetracycline (MIC of 16 mg/L), but did not contain *tet*(K), *tet*(L) or *tet*(M). In this respect, Ammor et al. [41] reported that pediococci are intrinsically resistant to the latter two antibiotics, as well as to glycopeptides (vancomycin and teicoplanin), streptomycin, ciprofloxacin and trimethoprim-sulphamethoxazole. Other authors proposed a MIC for tetracycline in pediococci ranging between 8 and 16 mg/L [42], or of 32 mg/L for oxytetracycline in *P. pentosaceus* [17]. The tetracycline breakpoints suggested for pediococci by EFSA are lower than the MICs observed in our work and others [17,42]. On the other hand, the only antibiotic resistance detected in *Leuconostoc* strains was for vancomycin, which is an intrinsic property of this genus. It has been previously reported that *Leuconostoc* strains display poor, if any, resistance to antibiotics of clinical interest [38]. With regard to lactococci, the three *L. cremoris* strains evaluated were susceptible to all the antibiotics; however, relatively high MICs for rifampicin (16–32 mg/L) and trimethoprim (≥ 64 mg/L) were detected. In fact, most lactococcal species are resistant to trimethoprim [41]. As expected, all strains of heterofermentative *Lactobacillus* spp. were resistant to vancomycin but susceptible to the rest of the assayed antibiotics, except *Lb. carnosus* B43, which showed the highest MIC for ampicillin and penicillin (MICs of 8 and 4 mg/L, respectively). In this context, the presence of modifications in the low affinity penicillin-binding protein (PBP) that confers resistance to penicillin and β -lactams in *E. faecium* and *Streptococcus pneumoniae*, has been reported [43,44]. Moreover, nine PBPs have been described in *Lb. casei* ATCC 393 [45], which leads us to suggest that a similar mechanism may be also responsible for the ampicillin and penicillin resistance found in *Lb. carnosus* B43. The resistance to vancomycin detected in *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* species in this study might be due to the presence of D-Ala-D-Lactate in their peptidoglycan rather than D-Ala-D-Ala dipeptide [46]. In this context, all tested *W. cibaria* strains showed MICs ≥ 128 mg/L for vancomycin, suggesting that vancomycin resistance is an intrinsic property of this species. In relation to *Weissella* spp., studies on antibiotic resistance profiles are very limited [47] and breakpoints have not been defined by EFSA [15]. In our study, most *W. cibaria* strains showed low MIC values; however *W. cibaria* BCS50 showed relatively high MICs for penicillin (8 mg/L) and kanamycin (64 mg/L), and *W. cibaria* SMA25 showed MICs of 128 mg/L for kanamycin, 8 mg/L for gentamicin, erythromycin and neomycin, and 2 mg/L for clindamycin. Therefore, these two strains were discarded of this study, while *W. cibaria* P50, P61, P64, P73, SMA14, SDM381 and SDM389 were not included in the final selection due to their MICs for kanamycin (32–

64 mg/L). According to these results, as a rule of thumb, we propose for *W. cibaria* the breakpoints assigned to *Leuconostoc* spp. by EFSA [15], until further studies establish the wild-type MIC ranges within this species. In spite of that, different MICs for rifampicin and trimethoprim for *W. cibaria* and *Lc. cremoris* were found in this study. The reduced susceptibility of *W. cibaria* towards trimethoprim could indicate an intrinsic resistance to this antibiotic [48]. In our work, the only antibiotic resistance genes found were *mef(A/E)*, which encodes a drug efflux pump conferring a low to moderate level of resistance to 14 (erythromycin and clarithromycin)- and 15 (azithromycin)-membered macrolides but not to lincosamide or streptogramin B antibiotics [49], and *lnu(A)*, encoding the lincosamide *O*-nucleotidyl-transferase that inactivates lincomycin and clindamycin [50]. In this respect, *P. pentosaceus* LPM78 and *W. cibaria* SMA25, displaying erythromycin resistance (MIC = 8 and ≥ 8 mg/L, respectively), carried the gene *mef(A/E)*, which can be found in a variety of Gram-positive bacteria, including corynebacteria, enterococci, micrococci, and several streptococcal species [51,52]. On the other hand, two pediococci (*P. pentosaceus* LPM78 and LPM83) that showed resistance to clindamycin (MIC = 4 and 2 mg/L, respectively) carried the gene *lnu(A)*, which had been only previously found in staphylococci, streptococci, enterococci and lactobacilli of animal origin and in staphylococci isolated from humans [50,53]. Strikingly, the clindamycin resistant strains *P. pentosaceus* LPP32 and B5 and *W. cibaria* SMA25 (MIC = 4 and 2 mg/L, respectively) did not harbour this gene nor *lnu(B)*. To our knowledge, this is the first description of *mef(A/E)* in the genera *Pediococcus* and *Weissella*, and *lnu(A)* in the genus *Pediococcus*. The detection of resistance genes for macrolide and lincosamide in non-enterococcal strains suggests a wider distribution of this group of genes than previously anticipated.

The *in vitro* subtractive screening proposed in this work also include the assessment of bile salts deconjugation, mucin degradation, biogenic amine production and other potentially detrimental enzymatic activities such as the β -glucuronidase activity, which should be absent in probiotic candidates [54-56]. Excessive deconjugation of bile salts may be unfavourable in animal production since unconjugated bile acids are less efficient than their conjugated counterparts in the emulsification of dietary lipids. In addition, the formation of micelles, lipid digestion and absorption of fatty acids and monoglycerides could be impaired by deconjugated bile salts [57]. Similarly, excessive degradation of mucin may be harmful as it may facilitate the translocation of bacteria to extraintestinal tissues [55]. In this respect, it is worthy to note that none of the 49 tested LAB deconjugated bile salts nor exhibited mucinolytic activity, the latter indicating their low invasive and toxigenic potential at the mucosal barrier. These results are in accordance with previous

findings showing that LAB do not degrade mucin *in vitro* [58,59]. Moreover, β -glucuronidase activity has been associated with the generation of potential carcinogenic metabolites [56]; however, none of the LAB tested in our study displayed this harmful enzymatic activity. In a previous work [60], we demonstrated that none of the 40 non-enterococcal strains evaluated herein produced histamine, tyramine or putrescine. With regard to enterococci, the nine *E. faecium* strains only produced tyramine, being *E. faecium* CV1 a low producer of this biogenic amine. Although the lack of biogenic amine production by probiotic strains is a desirable trait, it should be borne in mind that tyramine production by enterococci is a very frequent trait [60,61]. Finally, several studies have suggested that probiotic microorganisms might exert a beneficial effect in the digestion process of fish due to the production of extracellular enzymes [62-65]. In our work, the LAB strains of aquatic origin within the genera *Pediococcus*, *Enterococcus* and *Lactobacillus* showed a higher number of enzymatic activities than *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella*, being the enzymatic profiles similar amongst strains within the same genus. In this respect, nearly all the strains produced phosphatases, which might be involved in nutrient absorption [64], and peptidases and glucosidases that breakdown peptides and carbohydrates, respectively. However, the tested LAB showed weak lipolytic activity and no proteolytic activity.

Conclusions

This work shows that antimicrobial/bacteriocin activity against fish pathogens is a widespread probiotic property amongst LAB isolated from aquatic animals regarded as human food. However, particular safety concerns based on antibiotic resistances and virulence factors were dominant within *E. faecalis* (100%) and *E. faecium* (79%), and acquired antibiotic resistance genes were not commonly found (7.5%; erythromycin and clindamycin) amongst the non-enterococcal isolates of aquatic origin. To our knowledge, this is the first large-scale study describing the antimicrobial activity against fish pathogens and the safety assessment beyond the QPS approach of LAB isolated from aquatic animals. The *in vitro* subtractive screening presented herein, which allowed the selection of 33 strains (8 *E. faecium*, 11 *P. pentosaceus*, 1 *Lb. carnosus*, 1 *Lb. curvatus*, 3 *L. cremoris*, 3 *Lc. cremoris* and 6 *W. cibaria*) out of 99 LAB isolates of aquatic origin, constitutes a valuable strategy for the large-scale preliminary selection of putatively safe LAB intended for use as probiotics in aquaculture and to avoid the spreading of bacterial cultures with harmful traits into the aquatic environment. Nevertheless, a comprehensive *in vivo* assessment of their lack of toxicity and undesirable effects must be also carried out using cell lines, live food and, ultimately, aquatic animals

before their unequivocal consideration as safe probiotics for a sustainable aquaculture.

Methods

Bacterial strains and growth conditions

A total of 99 LAB (59 enterococci and 40 non-enterococci) of aquatic origin with antimicrobial activity against spoilage and food-borne pathogenic bacteria of concern for the fish industry, previously isolated and identified by our group from fish, seafood and fish products [14], were used in this study (Table 1). The LAB strains were isolated on non-supplemented MRS (Oxoid, Ltd., Basingstoke, United Kingdom) or KAA (Oxoid) agar (1.5%, w/v) at 25°C, and taxonomically identified [14] by sequencing of the genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) [66] and/or superoxide dismutase (*sodA*) [67]. Unless otherwise stated, LAB were grown aerobically in MRS broth at 32°C.

Direct antimicrobial activity assay

The antimicrobial activity of the 99 LAB against the main Gram-positive and Gram-negative fish pathogens was assayed by a qualitative stab-on-agar test (SOAT) as previously described by Cintas *et al.* [68]. Briefly, pure cultures were stabbed onto MRS or Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid) plates supplemented with glucose (2%, w/v) and incubated at 32°C for 5 h, and then 40 ml of the corresponding soft agar (0.8%, w/v) medium containing about 1×10^5 CFU/ml of the indicator strain was poured over the plates. After incubation at 28–37°C for 16–24 h depending on the indicator strain, the plates were checked for inhibition zones (absence of visible microbial growth around the stabbed cultures), and only inhibition halos with diameters >3 mm were considered positive. *L. garvieae* JIP29-99 was grown aerobically in Tryptone Soya Broth (TSB) (Oxoid) at 37°C. *S. agalactiae* CF01173 and *S. iniae* LMG14521 were grown aerobically in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Oxoid) at 37°C. *A. hydrophila* CECT5734, *Ls. anguillarum* CECT4344, *Ls. anguillarum* CECT7199, and *Ph. damsela* CECT626 strains were grown aerobically in TSB at 28°C. *V. alginolyticus* CECT521 was grown aerobically in TSB supplemented with NaCl (1%, w/v; Panreac Química S.A.U, Barcelona, Spain) at 28°C.

Extracellular antimicrobial activity assay

The antimicrobial activity of supernatants from LAB cultures grown in MRS broth at 32°C for 16 h was determined by an agar well-diffusion test (ADT) as previously described by Cintas *et al.* [68]. Supernatants were obtained by centrifugation of cultures at $10,000 \times g$ at 4°C for 10 min, adjusted to pH 6.2 with 1 M NaOH, filter-sterilized through 0.22 µm-pore-size filters (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA) and stored at -20°C until use. Fifty-µl aliquots of cell-free culture supernatants were placed into wells (6-mm diameter) cut in cooled MRS

or TSB agar (0.8%, wt/vol) plates previously seeded (1×10^5 CFU/ml) with the indicator microorganisms *Pedococcus damnosus* CECT4797, *L. garvieae* JIP29-99 or *A. hydrophila* CECT5734. After 2 h at 4°C, the plates were incubated under the same conditions mentioned above to allow for the growth of the target microorganisms and then analyzed for the presence of inhibition zones around the wells. To determine the proteinaceous nature of the antimicrobial compounds, supernatants showing antimicrobial activity were subjected to proteinase K treatment (10 mg/ml) (AppliChem GmbH, Germany) at 37°C for 2 h. After proteinase K inactivation by heat treatment (100°C, 10 min), samples were assayed for residual antimicrobial activity by an ADT as described above using *P. damnosus* CECT4797 as indicator microorganism. Supernatants with no added enzyme were treated as indicated above and used as controls. For further characterization of the antimicrobial compounds, 7 ml of supernatants from an overnight culture of LAB were subjected to peptide concentration by ammonium sulphate precipitation. Ammonium sulphate was gradually added to the supernatants to achieve 50% saturation. Samples were kept at 4°C with stirring for 3 h, and then centrifuged at $10,000 \times g$ at 4°C for 30 min. Pellets and floating solid material were combined and solubilized in 350 µl of 20 mM sodium phosphate (pH 6.0), and antimicrobial activity of the resulting 20-fold concentrated supernatants was determined by an ADT as described above.

PCR detection of potential virulence factors in enterococci

Detection of genes encoding potential virulence factors in the 59 enterococci was performed by PCR. The following primer pairs were used: TE3/TE4 for detection of *agg* (aggregation substance), TE9/TE10 for *gelE* (gelatinase), TE34/TE36 for *esp* (enterococcal surface protein), TE5/TE6 for *efaAfs* (*Enterococcus faecalis* endocarditis antigen) [32], HYLn1/HYLn2 for *hyl* (hyaluronidase) [35], CYLL_L-R1/CYLL_S-R2 for *cylL_L-cylL_S* (cytolysin precursor) [69], and RHCT1/RHCT2 for *cylL_L-cylL_S-cylM* (cytolysin precursor and posttranslational modifier) [70]. Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, United Kingdom). The positive control strains for detection of potential virulence factors were the following: *E. faecalis* P4 for *cylL_L-cylL_S*, *cylL_L-cylL_S-cylM*, *agg*, *gelE* and *efaAfs*, *E. faecalis* P36 for *esp* [32], and *E. faecium* C68 for *hyl* [35]. PCR-amplifications were performed from total bacterial DNA obtained using the Wizard DNA Purification Kit (Promega, Madrid, Spain) in 25 µl reaction mixtures with 1 µl of purified DNA, 0.7 µM of each primer, 0.2 mM of each dNTP, buffer 1×, 1.5 mM MgCl₂ and 0.75 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Madrid, Spain). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97°C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C for

45 s), annealing (48 to 64°C for 30 s) and elongation (72°C for 30 to 180 s), ending with a final extension step at 72°C for 7 min in an Eppendorf Mastercycler thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). PCR products were analyzed by electrophoresis on 1-2% (w/v) agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels stained with Gel red (Biotium, California, USA), and visualized with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad, Madrid, Spain). The molecular size markers used were HyperLadder II (Bioline GmbH, Germany) and 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

Production of gelatinase by enterococci

Gelatinase production was determined using the method previously described by Eaton and Gasson [32]. Briefly, enterococci were grown in MRS broth overnight at 32°C, and streaked onto Todd-Hewitt (Oxoid) agar plates (1.5%, w/v) containing 30 g of gelatine per litre. After incubation overnight incubation at 37°C, the plates were placed at 4°C for 5 h before examination for zones of turbidity (protein hydrolysis) around the colonies. *E. faecalis* P4 was used as positive control.

Production of hemolysin

To investigate hemolysin production by the 99 LAB, the strains grown in MRS broth were streaked onto layered fresh horse blood agar plates (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and grown at 37°C for 1–2 days [32]. β-hemolysis was revealed by the formation of clear zones surrounding the colonies on blood agar plates. *E. faecalis* P4 was used as positive control.

Determination of antibiotic susceptibility

Antibiotic susceptibility of the 59 enterococci was determined by overlaying antibiotic-containing disks (Oxoid) on Diagnostic Sensitivity Test Agar (Oxoid) previously seeded with approximately 1×10^5 CFU/ml of each enterococcal isolate. The antibiotics tested were ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (120 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg), penicillin G (10 IU), rifampicin (5 µg), teicoplanin (30 µg), tetracycline (30 µg), and vancomycin (30 µg). Inhibition zone diameters were measured after overnight incubation of the plates at 37°C. Resistance phenotypes were recorded as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute [71]. *E. faecalis* CECT795 and *Staphylococcus aureus* CECT435 were used for quality control. The minimum inhibitory concentration for the 49 pre-selected LAB was determined by a broth microdilution test using e-cocci (for enterococci), and Lact-1 and Lact-2 (for non-enterococcal strains) VetMIC microplates (National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden). The antibiotics evaluated for enterococci were ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol,

narasin, and linezolid, while for the non-enterococcal strains, the tested antibiotics were ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol, neomycin, penicillin, linezolid, ciprofloxacin, rifampicin, and trimethoprim. Individual colonies were suspended in a sterile glass tube containing 5 ml saline solution (0.85% NaCl) to a turbidity of 1 in the McFarland scale (approx. 3×10^8 CFU/ml) and further diluted 1000-fold. Iso-sensitest (IST) broth (Oxoid) was used for enterococci, while LSM medium (IST:MRS, 9:1) was used for all the non-enterococcal strains except *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* BCS35, that required LSM broth supplemented with 0.03% (w/v) L-cysteine (Merck KGaA) [72]. Fifty or 100 µl of the diluted enterococcal and non-enterococcal suspensions, respectively, was added to each microplate well which was then sealed with a transparent covering tape and incubated at 37°C for 18 h (in the case of *Lb. curvatus* BCS35, the plates were incubated anaerobically at 32°C for 18 h). After incubation, MICs were established as the lowest antibiotic concentration that inhibited bacterial growth, and interpreted according to the breakpoints identified by the FEE-DAP Panel and adopted by EFSA to distinguish between susceptible and resistant strains [15]. Accordingly, strains showing MICs higher than the respective breakpoint were considered as resistant. *E. faecalis* CECT795 and *S. aureus* CECT794 were used for quality control of e-cocci, and Lact-1 and Lact-2 VetMIC microplates, respectively.

Deconjugation of bile salts

The ability of the 49 pre-selected LAB to deconjugate primary and secondary bile salts was determined according to Noriega et al. [73]. Bile salt plates were prepared by adding 0.5% (w/v) sodium salts of taurocholate (TC) and taurodeoxycholate (TDC) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA) to MRS agar (1.5%, w/v) supplemented with 0.05% (w/v) L-cysteine (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Overnight liquid cultures of strains (10 µl) were spotted onto agar plates and incubated under anaerobic conditions (Anaerogen, Oxoid) at 37°C for 72 h. The presence of precipitated bile acid around the colonies (opaque halo) was considered as a positive result. A fresh fecal slurry of a healthy adult horse was used as positive control for bile salts deconjugating activities.

Degradation of mucin

The capacity of the 49 pre-selected LAB to degrade gastric mucin was determined as described by Zhou et al. [58]. Mucin from porcine stomach type III (Sigma-Aldrich Corp.) and agar were added to medium B without glucose at concentrations of 0.5% (w/v) and 1.5% (w/v), respectively. A volume of 10 µl of 24 h viable bacterial cultures was inoculated onto the surface of medium B. The

plates were incubated anaerobically at 37°C for 72 h, subsequently stained with 0.1% (w/v) amido black (Merck KGaA) in 3.5 M acetic acid for 30 min, and then washed with 1.2 M acetic acid (Merck KGaA). A discoloured zone around the colony was considered as a positive result. A fresh fecal slurry of a healthy adult horse was used as positive control for mucin degradation ability.

Determination of enzymatic activities

The APIZYM test (BioMérieux, Montallieu Vercieu, France) was used for determination of enzymatic activities of the 49 pre-selected LAB. Cells from cultures grown at 32°C overnight were harvested by centrifugation at 12,000 g for 2 min, resuspended in 2 ml of API Suspension Medium (BioMérieux) and adjusted to a turbidity of 5–6 in the McFarland scale (approx. $1.5-1.9 \times 10^9$ CFU/ml). Aliquots of 65 µl of the suspensions were added to each of the 20 reaction cupules in the APIZYM strip. The strips were incubated at 37°C for 4.5 h and the reactions were developed by addition of one drop each of the APIZYM reagents A and B. Enzymatic activities were graded from 0 to 5, and converted to nanomoles as indicated by the manufacturer's instructions.

PCR detection of antibiotic resistance genes

The presence of genetic determinants conferring resistance to aminoglycosides except streptomycin [*aac*(6')-*Ie-aph*(2')-*Ia*], to erythromycin [*erm*(A), *erm*(B), *erm*(C) and *mef*(A/E)], to tetracycline [*tet*(K), *tet*(L) and *tet*(M)], and to lincosamides [*lnu*(A) and *lnu*(B)] was determined by PCR in the LAB strains showing antibiotic resistance by the VetMIC assay. PCR-amplifications and PCR-product visualization and analysis were performed as described above using the following primer-pairs: *aacF/aacR* for detection of *aac*(6')-*Ie-aph*(2')-*Ia* [74], *ermAI/ermAII* for *erm*(A) [75,76], *ermBI/ermBII* for *erm*(B) [17], *ermCI/ermCII* for *erm*(C) [17,77], *mef*(A/E)I/ *mef*(A/E)II for *mef*(A/E) [75,76], *tetKI/ tetKII* for *tet*(K) [17], *tetLI/ tetLII* for *tet*(L) [17,78], *tetMI/tetMII* for *tet*(M) [17,78], *lnuA1/lnuA2* for *lnu*(A) [79], *lnuB1/lnuB2* for *lnu*(B) [50]. *E. faecalis* C1570 was used as positive control for amplification of *erm*(C), *lnu*(A) and *tet*(K) and *E. faecalis* C1231 for *erm*(A). *E. faecium* 3Er1 (clonal complex of hospital-associated strain CC9) and *E. faecium* RC714 were used as positive controls for amplification of *aac*(6')-*Ie-aph*(2')-*Ia*, *tet*(M) and *tet*(L), and for *erm*(B) and *mef*(A/E), respectively. The amplicons obtained with *mef*(A/E) and *lnu*(A) specific primers were purified by using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) and both DNA strands were sequenced at the Unidad de Genómica (Parque Científico de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain). Analysis of DNA sequences was performed

with the BLAST program available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Abbreviations

LAB: Lactic Acid Bacteria; FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations; WHO: World Health Organization; EFSA: European Food Safety Agency; QPS: Qualified Presumption of Safety; EC: European Commission; MRS: de Man, Rogosa and Sharpe; KAA: Kanamycin, Aesculin Azide.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

EMA carried out the phenotypic and genetic analyses, prepared the manuscript draft and participated in the design of the experiments. BGS carried out the isolation of the LAB strains and collaborated in the genetic studies. CA contributed to the phenotypic analyses and to prepare the manuscript draft. CC participated in the phenotypic analyses. RC collaborated in the antibiotic susceptibility tests. LMC conceived the study and, together with CH and PEH, designed the experiments, analyzed the results and revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

This work was partially supported by projects AGL2009 – 08348-ALI from Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT), Spain; GR35/10-A from Banco Santander-Central Hispano-Universidad Complutense de Madrid (UCM), Spain; S – 2009/AGR – 1489 from Dirección General de Universidades e Investigación, Consejería de Educación, Comunidad de Madrid, Spain, and Spanish-Portuguese Integrated Action HP2008-0070 from Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), Spain. E. Muñoz-Atienza is recipient of a predoctoral fellowship from UCM, Spain. C. Araújo is financially supported by a predoctoral fellowship from Fundação da Ciência e Tecnologia, Portugal. C. Campanero holds a predoctoral fellowship from UCM, Spain. The authors express their gratitude to Dr. C. Michel, INRA, Jouy-en-Josas, France, for providing a number of fish pathogens strains used as indicators and to Dr. C. Torres, Universidad de la Rioja, Spain; Dr. T.J. Eaton, Institute of Food Research, Norwich, United Kingdom, and Dr. V. Vankerckhoven, University of Antwerp, Belgium, for supplying strains used as PCR controls.

Author details

¹Grupo de Seguridad y Calidad de los Alimentos por Bacterias Lácticas, Bacteriocinas y Probióticos (Grupo SEGABALBP) Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain. ²Centro de Genética e Biotecnología, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal. ³Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid 28034, Spain.

Received: 23 July 2012 Accepted: 18 December 2012

Published: 24 January 2013

References

1. FAO: FAO Fisheries Department. State of world aquaculture 2006. *FAO Fish Tech Pap* 2006, 500:1–134.
2. FAO: Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fish Tech Pap* 2005, 469:1–97.
3. Cabello FC: Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol* 2006, 8:1137–1144.
4. Austin B: The bacterial microflora of fish, revised. *ScientificWorldJournal* 2006, 6:931–945.
5. Robertson PAW, O'Dowd C, Burrells C, Williams P, Austin B: Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* 2000, 185:235–243.
6. Wang Y-B, Li J-R, Lin J: Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture* 2008, 281:1–4.
7. Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P: Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr Opin Microbiol* 2011, 14:251–258.

Muñoz-Atienza et al. BMC Microbiology 2013, 13:15
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/15

8. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W: **Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, **64**:655–671.
9. Gatesoupe FJ: **Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008, **14**:107–114.
10. FAO/WHO: **Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation.** *FAO Food Nutr Pap* 2006, **85**:1–50.
11. EC: **On a generic approach to the safety assessment of microorganisms used in feed/food and feed/food production - A working paper open for comment;** 2003. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf.
12. EFSA: **Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA.** *The EFSA Journal* 2007, **5**:1–16.
13. EFSA: **Maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update).** *The EFSA Journal* 2011, **9**:1–82.
14. Gómez-Sala B, Basanta A, Sánchez J, Martín M, Criado R, Gutiérrez J, Citti R, Herranz C, Hernández PE, Cintas LM: **Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and fish products.** In *13ème Colloque du Club des Bactéries Lactiques, p 45 Abstracts*. Nantes, France: ENITIAA and French National Institute for Agricultural Research (INRA); 2004.
15. EFSA: **Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance.** *EFSA Journal* 2012, **10**:2740–2749.
16. Collins MD, Samelis J, Metaxopoulos J, Wallbanks S: **Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species.** *J Appl Bacteriol* 1993, **75**:595–603.
17. Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeter G, Hildebrandt B, Müller-Bertling S, Witte W, Goossens H: **Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**:900–912.
18. Ringø E, Gatesoupe FJ: **Lactic acid bacteria in fish: a review.** *Aquaculture* 1998, **160**:177–203.
19. Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Le Chevalier P, Fleury Y: **Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic.** *Mar Drugs* 2010, **8**:1153–1177.
20. O'Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C: **Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid.** *Int J Food Microbiol* 2012, **152**:189–205.
21. Gillor O, Etzion A, Riley MA: **The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **81**:591–606.
22. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG: **Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:7617–7621.
23. Vendrell D, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuola I, de Blas I, Girones O, Muzquiz JL: ***Lactococcus garvieae* in fish: a review.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2006, **29**:177–198.
24. Decamp O, Moriarty D: **Aquaculture species profit from probiotics.** *Feed Mix* 2007, **15**:20–23.
25. Dimitroglou A, Merrifield DL, Carnevali O, Picchiatti S, Avella M, Daniels C, Güroy D, Davies SJ: **Microbial manipulations to improve fish health and production - A Mediterranean perspective.** *Fish Shellfish Immunol* 2011, **30**:1–16.
26. Nikoskelainen S, Salminen S, Bylund G, Ouwehand AC: **Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:2430–2435.
27. Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Muzquiz JL, Girones O: **Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish.** *Aquaculture* 2008, **278**:188–191.
28. Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Børgwald J, Castex M, Ringø E: **The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids.** *Aquaculture* 2010, **302**:1–18.
29. Das S, Ward LR, Burke C: **Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture.** *Aquaculture* 2010, **305**:32–41.
30. Wang Y-B, Tian Z-Q, Yao J-T, Li W: **Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response.** *Aquaculture* 2008, **277**:203–207.
31. Olmos J, Ochoa L, Paniagua-Michel J, Contreras R: **Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fish meal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and *Bacillus* probiotic strains.** *Mar Drugs* 2011, **9**:1119–1132.
32. Eaton TJ, Gasson MJ: **Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:1628–1635.
33. Gomes BC, Esteves CT, Palazzo IC, Darini AL, Felis GE, Sechi LA, Franco BD, De Martinis EC: **Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods.** *Food Microbiol* 2008, **25**:668–675.
34. López M, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Martínez S, del Campo R, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Torres C: **Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425.** *Int J Food Microbiol* 2009, **133**:172–178.
35. Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H: **Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:4473–4479.
36. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, Borgmann S, Schulte B, Jonas D, Serr A, et al: **Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005, **24**:815–825.
37. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, Klare I, Kristinsson KG, Leclercq R, Lester CH, et al: **Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe.** *Euro Surveill* 2008, **13**:1–11.
38. Ogier JC, Serror P: **Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus.** *Int J Food Microbiol* 2008, **126**:291–301.
39. Danielsen M, Wind A: **Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents.** *Int J Food Microbiol* 2003, **82**:1–11.
40. Vay C, Cittadini R, Barberis C, Hernán Rodríguez C, Perez Martínez H, Genero F, Famiglietti A: **Antimicrobial susceptibility of non-enterococcal intrinsic glycopeptide-resistant Gram-positive organisms.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007, **57**:183–188.
41. Ammor MS, Flórez AB, Mayo B: **Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria.** *Food Microbiol* 2007, **24**:559–570.
42. Danielsen M, Simpson PJ, O'Connor EB, Ross RP, Stanton C: **Susceptibility of *Pediococcus* spp. to antimicrobial agents.** *J Appl Microbiol* 2007, **102**:384–389.
43. Klare I, Konstabel C, Badstübner D, Werner G, Witte W: **Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*.** *Int J Food Microbiol* 2003, **88**:269–290.
44. Albarracín Orio AG, Piñas GE, Cortes PR, Cian MB, Echenique J: **Compensatory evolution of *pbp* mutations restores the fitness cost imposed by beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*.** *PLoS Pathog* 2011, **7**:e1002000.
45. Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM: **Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*.** *J Appl Microbiol* 2005, **98**:84–95.
46. Klein G, Hallmann C, Casas IA, Abad J, Louwers J, Reuter G: **Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods.** *J Appl Microbiol* 2000, **89**:815–824.
47. Ayeni FA, Sánchez B, Adeniyi BA, de Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Ruas-Madiedo P: **Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine.** *Int J Food Microbiol* 2011, **147**:97–104.
48. Ayeni FA, Adeniyi BA, Ogunbanwo ST, Tabasco R, Paarup T, Peláez C, Requena T: **Inhibition of uropathogens by lactic acid bacteria isolated from dairy foods and cow's intestine in western Nigeria.** *Arch Microbiol* 2009, **191**:639–648.
49. Del Grosso M, Iannelli F, Messina C, Santagati M, Petrosillo N, Stefani S, Pozzi G, Pantosti A: **Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:774–778.
50. Bozdoğan B, Berrezouga L, Kuo MS, Yurek DA, Farley KA, Stockman BJ, Leclercq R: **A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidyllation in *Enterococcus faecium* HM1025.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:925–929.

Muñoz-Atienza et al. BMC Microbiology 2013, 13:15
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/13/15

51. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H: **Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:2823–2830.
52. Leclercq R: **Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications.** *Clin Infect Dis* 2002, **34**:482–492.
53. Achard A, Villers C, Pichereau V, Leclercq R: **New *lnu(C)* gene conferring resistance to lincomycin by nucleotidylation in *Streptococcus agalactiae* UCN36.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:2716–2719.
54. Marteau P, Gerhardt MF, Myara A, Bouvier E, Trivin F, Rambaud JC: **Metabolism of bile salts by alimentary bacteria during transit in the human small intestine.** *Microb Ecol Health D* 1995, **8**:151–157.
55. Ruseler-van Embden JG, van Lieshout LM, Gosselink MJ, Marteau P: **Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins.** *Scand J Gastroenterol* 1995, **30**:675–680.
56. Heavey PM, Rowland IR: **Microbial-gut interactions in health and disease, Gastrointestinal cancer.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004, **18**:323–336.
57. Begley M, Gahan CG, Hill C: **The interaction between bacteria and bile.** *FEMS Microbiol Rev* 2005, **29**:625–651.
58. Zhou JS, Gopal PK, Gill HS: **Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin *in vitro*.** *Int J Food Microbiol* 2001, **63**:81–90.
59. Delgado S, O'Sullivan E, Fitzgerald G, Mayo B: **Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics.** *J Food Sci* 2007, **72**:M310–M315.
60. Muñoz-Atienza E, Landeta G, De Las Rivas B, Gómez-Sala B, Muñoz R, Hernández PE, Cintas LM, Herranz C: **Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products.** *Int J Food Microbiol* 2011, **146**:212–216.
61. Ladero V, Fernández M, Calles-Enríquez M, Sánchez-Llana E, Canedo E, Martín MC, Alvarez MA: **Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci?** *Food Microbiol* 2012, **30**:132–138.
62. Ringø E, Strom E, Tabachek JA: **Intestinal microflora of salmonids: a review.** *Aquac Res* 1995, **26**:773–789.
63. Bairagi A, Sarkar Ghosh K, Sen SK, Ray AK: **Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts.** *Aquacult Int* 2002, **10**:109–121.
64. Ramirez RF, Dixon BA: **Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oysters (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*).** *Aquaculture* 2003, **227**:417–426.
65. Fjellheim AJ, Klinkenberg G, Skjermo J, Aasen IM, Vadstein O: **Selection of candidate probiotics by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae.** *Vet Microbiol* 2010, **144**:153–159.
66. Kullen MJ, Sanosky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR: **Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex.** *J Appl Microbiol* 2000, **89**:511–516.
67. Poyart C, Quesnes G, Trieu-Cuot P: **Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**:415–418.
68. Cintas LM, Rodríguez JM, Fernández MF, Sletten K, Nes IF, Hernández PE, Holo H: **Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum.** *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**:2643–2648.
69. Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB: **Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants.** *J Bacteriol* 1994, **176**:7335–7344.
70. Hickey RM, Twomey DP, Ross RP, Hill C: **Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors.** *Microbiology* 2003, **149**:655–664.
71. CLSI: **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100–S21.** Wayne, PA, USA: CLSI; 2011.
72. Klare I, Konstabel C, Müller-Bertling S, Reissbrodt R, Huys G, Vancanneyt M, Swings J, Goossens H, Witte W: **Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and *Bifidobacteria*.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:8982–8986.
73. Noriega L, Cuevas I, Margolles A, Reyes-Gavilán CG DI: **Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile.** *Int Dairy J* 2006, **16**:850–855.
74. Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E, Perri MB, Chow JW, Bartlett P, Jones R, Joyce K, Rossiter S, Gay K, et al: **Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:1109–1113.
75. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L: **Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR.** *Antimicrob Agents Chemother* 1996, **40**:2562–2566.
76. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L: ***Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system.** *Antimicrob Agents Chemother* 1996, **40**:1817–1824.
77. Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W: **Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:4089–4094.
78. Werner G, AWillems RJ, Hildebrandt B, Klare I, Witte W: **Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**:1499–1506.
79. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J: **Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:1062–1066.

doi:10.1186/1471-2180-13-15

Cite this article as: Muñoz-Atienza et al.: Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiology* 2013 13:15.

CAPÍTULO IV

Evaluación fenotípica y genotípica de la producción de aminas biógenas por bacterias lácticas aisladas de pescado y productos de la pesca

CHAPTER IV

Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products

International Journal of Food Microbiology (2011), 146: 212–216



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Short Communication

Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products

Estefanía Muñoz-Atienza^a, Gerardo Landeta^b, Blanca de las Rivas^b, Beatriz Gómez-Sala^a, Rosario Muñoz^b, Pablo E. Hernández^a, Luis M. Cintas^a, Carmen Herranz^{a,*}

^a Grupo de Seguridad y Calidad de los Alimentos por Bacterias Lácticas, Bacteriocinas y Probióticos (Grupo SEGABALBP), Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2010

Received in revised form 9 February 2011

Accepted 20 February 2011

Keywords:

Fish

Lactic acid bacteria

Enterococci

Fish probiotic

Biogenic amine

Tyramine

ABSTRACT

In this work, biogenic amine production (histamine, tyramine and putrescine) by a collection of 74 lactic acid bacteria of aquatic origin has been investigated by means of amino acid decarboxylation by growth on decarboxylase differential medium, biogenic amine detection by thin-layer chromatography (TLC) and decarboxylase gene detection by PCR. None of the evaluated strains showed neither production of histamine and putrescine, nor presence of the genetic determinants encoding the corresponding decarboxylase activities. However, the tyrosine decarboxylase gene (*tdc*) was present in all the enterococcal strains, and tyramine production was detected by TLC in all of them but *Enterococcus faecium* BCS59 and MV5. Analysis of the tyrosine decarboxylase operon of these strains revealed the presence of an insertion sequence upstream *tdc* that could be responsible for their lack of tyrosine decarboxylase activity.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Biogenic amines (BAs) are low molecular weight organic bases with biological activity (ten Brink et al., 1990). The presence of BAs in foods might be partly due to amino acid decarboxylation by microbial enzymes (Halász et al., 1994; ten Brink et al., 1990). In non-fermented foods (mainly fish), BAs are produced by undesirable microorganisms and are indicative of food spoilage; on the other hand, since many lactic acid bacteria (LAB) might be involved in BA production, LAB starter cultures devoid of amino acid decarboxylase activity should be carefully selected to avoid the presence of high amounts of BAs in fermented foods (Silla, 1996; ten Brink et al., 1990). Notwithstanding their physiological functions in living cells (Halász et al., 1994; Silla, 1996), the presence of some BAs at high levels in foods represents a public health issue due to the risk of intoxication. In this context, the BAs most frequently involved in food intoxication are histamine and tyramine, produced from the precursor amino acids histidine and tyrosine by the histidine decarboxylase (HDC) and tyrosine decarboxylase (TDC) enzymes, respectively. Histamine, with an upper limit for human consumption of 100 mg/kg in some fishery products in the

European Union [Commission Regulation (EC) No 1441/2007] is responsible for the so-called “scombroid poisoning”. This food intoxication, mainly associated with the fish family *Scombridae*, can include cutaneous (primarily facial flush), gastrointestinal, haemodynamic (hypotension) and/or neurologic symptoms (Lehane and Olley, 2000). On the other hand, although no science-based risk assessment has been conducted, a threshold value for tyramine consumption of 100–800 mg/kg has been suggested (ten Brink et al., 1990). Tyramine poisoning, which has been generally associated with the consumption of aged cheese, is characterized by high blood pressure, headache, fever and sometimes vomiting. However, individuals with a genetically or pharmacologically impaired monoamine oxidase (MAO) detoxification system may suffer dietary migraines and a sudden increase in blood pressure (hypertensive crisis) at considerably lower tyramine concentrations (Silla, 1996; ten Brink et al., 1990).

Other BAs, such as putrescine, produced from ornithine by the ornithine decarboxylase (ODC) enzyme, may potentiate the toxicity of the above mentioned BAs due to interference with their detoxification systems. Moreover, secondary amines can react with nitrites in food to produce potentially carcinogenic nitrosamines (Halász et al., 1994).

LAB are being increasingly employed as probiotics to improve human and animal health (Kalliomäki et al., 2008; Verschuere et al., 2000). In this context, our research group is currently investigating the suitability of a collection of LAB with antimicrobial activity isolated from fish and fish products as probiotics for aquaculture. For this purpose, a careful safety evaluation of the strains, including,

* Corresponding author at: Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913944091; fax: +34 913943743.

E-mail address: cherranz@vet.ucm.es (C. Herranz).

CAPÍTULO V

**Evaluación de la seguridad y tipificación molecular de cepas
de *Enterococcus faecium* de origen alimentario
mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado
(PFGE) y diversas técnicas moleculares de tipificación
basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

CHAPTER V

***Safety assessment and molecular genetic profiling by pulsed-
field gel electrophoresis (PFGE) and PCR-based techniques
of Enterococcus faecium strains of food origin***

**Manuscrito enviado a *LWT Food Science and Technology*
para su evaluación**

V.1. ABSTRACT

Enterococcus faecium is authorized as animal probiotic in the European Union, but this microorganism has emerged as an important cause of nosocomial infections in humans. We investigated the safety of 14 potential probiotic *E. faecium* strains with antimicrobial activity, previously isolated from food, following the guidance proposed by EFSA. None of the enterococci harboured the genes encoding the enterococcal surface protein (*esp*), putative glycosyl hydrolase (*hyl_{Efm}*), and mobile insertion sequence IS16 element. All strains were susceptible to ampicillin. The genetic relatedness of these enterococci was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), random amplified polymorphic DNA (RAPD), enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) and restriction analysis of amplified 16S rDNA (ARDRA). PFGE analysis of *Sma*I patterns evidenced four subgroups, whereas RAPD and ERIC-PCR analysis gave nine and eight different subgroups, respectively. ERIC-PCR yielded the highest diversity, followed by RAPD and PFGE, while ARDRA achieved the lowest diversity. In conclusion, this work demonstrates the absence of several well-known enterococcal virulence markers in a collection of *E. faecium* strains with antimicrobial activity, which renders them safe to be used in the food industry or as probiotics in animal production, as well as that ERIC-PCR is a reliable tool for the molecular genetic profiling of potential probiotic enterococci.

Keywords: *Enterococcus faecium*; food origin; safety assessment; genetic relatedness.

V.2. INTRODUCTION

Enterococcus faecium is a natural commensal of the human and animal gastrointestinal tract and has been frequently isolated from dairy products, fermented sausages, vegetables, fish, water and soils (Cintas *et al.*, 1997; Giraffa, 2002; Gomes *et al.*, 2008; Ogier and Serror, 2008; Araújo *et al.*, 2011). However, *E. faecium* has emerged as an important cause of nosocomial infections due to their ability to acquire resistance to antibiotics, most importantly to penicilin/ampicillin, aminoglycosides (high-level resistance) and glycopeptides, and to accumulate virulence factors (Rice *et al.*, 2003; Klare *et al.*, 2005; Leavis *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2008; Arias and Murray, 2012). Despite this fact, some strains are currently used in the food industry and authorized as animal probiotics. According to EFSA, a case-by-case approach, including (i) the strain identification using molecular methods, (ii) the lack of ampicillin resistance, and (iii) the lack of the three genetic elements associated with the hospital enterococcal strains encoding the enterococcal surface protein (*esp*), putative glycosyl hydrolase (*hyl_{Efm}*) (initially

described as a hyaluronidase), and mobile insertion sequence IS16 element, must be adopted to demonstrate the safety of *E. faecium* strains (EFSA, 2012).

In addition to exclude high-risk hospital-adapted *E. faecium* clones, the strain typing has been considered to assess the safety of potential probiotic using molecular methods (Vankerckhoven *et al.*, 2008). In the last years, the use of reliable genotyping methods for microbial identification at strain level has supposed an important progress in several areas, including food microbiology and technology (Jurkovič *et al.*, 2007; Martín-Platero *et al.*, 2009), epidemiological and clinical microbiology (Leavis *et al.*, 2003; Vankerckhoven *et al.*, 2004; Klare *et al.*, 2005), and microbial ecology (Michel *et al.*, 2007). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and PCR-based typing methods (*e.g.*, random amplified polymorphic DNA [RAPD], enterobacterial repetitive intergenic consensus [ERIC-PCR] and restriction analysis of amplified 16S rDNA [ARDRA]) have been used to study the genetic diversity of *E. faecium* strains isolated from different origins (Jurkovič *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2010).

In the last years, our group has isolated and characterized a number of *E. faecium* strains, including some bacteriocin-producing strains, from different origins such as dairy and meat products (Cintas *et al.*, 1995; Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997), wild and hunting animals (Martín *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2011), and fish, seafood and fish products (Almeida *et al.*, 2011; Muñoz-Atienza *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2015). Due to their interesting biotechnological properties, some of these strains, including 14 enterococci, are potential candidates for their application in the food industry or as probiotics in animal production. In this work, we present (i) the safety assessment of the 14 *E. faecium* strains following the EFSA guidance (EFSA, 2012), including the evaluation of virulence markers (*esp*, *hyl_{Efm}* and IS16) and ampicillin susceptibility, to exclude enterococcal strains belonging to the high-risk hospital adapted clones, and (ii) the comparative analysis of four genotyping techniques (PFGE, RAPD, ERIC-PCR and ARDRA) as tools to determine the genetic relatedness of these enterococci.

V.3. MATERIALS AND METHODS

V.3.1. Bacterial strains and growth conditions

Fourteen *E. faecium* strains with antimicrobial activity, previously isolated from food and taxonomically identified were used in this study (Table 1). These strains were grown aerobically in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid, Ltd., Basingstoke, United Kingdom) at 37 °C.

Table V.1. Origin of the *E. faecium* strains used in this study.

Strain	Origin	Reference
BNM58	Albacora (<i>Thunnus alalunga</i>)	Muñoz-Atienza <i>et al.</i> (2013)
CV1	European squid (<i>Loligo vulgaris</i>)	Muñoz-Atienza <i>et al.</i> (2013)
CV2	European squid (<i>L. vulgaris</i>)	Muñoz-Atienza <i>et al.</i> (2013)
LPP29	European seabass (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Muñoz-Atienza <i>et al.</i> (2013)
SMA7	Cold-smoked Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	Muñoz-Atienza <i>et al.</i> (2013)
SMA8	Cold-smoked Atlantic salmon (<i>S. salar</i>)	Muñoz-Atienza <i>et al.</i> (2013)
SMF8	Atlantic salmon (<i>S. salar</i>)	Muñoz-Atienza <i>et al.</i> (2013)
TPM76	Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Muñoz-Atienza <i>et al.</i> (2013)
TPP2	Rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	Muñoz-Atienza <i>et al.</i> (2013)
T2	Mullet (<i>Liza ramada</i>)	Almeida <i>et al.</i> (2011)
T29	Mullet (<i>L. ramada</i>)	Almeida <i>et al.</i> (2011)
L50	Spanish dry-fermented sausage	Cintas <i>et al.</i> (1995)
P13	Spanish dry-fermented sausage	Cintas <i>et al.</i> (1997)
T136	Spanish dry-fermented sausage	Casaus <i>et al.</i> (1997)

V.3.2. PCR detection of virulence markers

Detection of virulence markers (*esp*, *hyl_{Efm}* and *IS16*) in the 14 *E. faecium* strains was performed by PCR following the EFSA guidance (EFSA, 2012). The specific oligonucleotide primers and cycling conditions are shown in Table 2. The oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, United Kingdom). PCR-amplifications were performed from total genomic DNA from *E. faecium* strains obtained by the Wizard DNA Purification Kit (Promega, Madrid, Spain) in 25 µL reaction mixtures with 5 to 50 ng of purified DNA, 0.7 µM of each primer and MyTaq Mix 1× (Bioline, GmbH, Germany) using an Eppendorf Mastercycler thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The positive control strains for detection of markers associated with the hospital strains were the following: *E. faecalis* P36 for *esp* (Eaton and Gasson, 2001), *E. faecium* C68 for *hyl_{Efm}* (Vankerckhoven *et al.*, 2004), and *E. faecium* P2-5 (clonal complex 17 [CC17] adapted to the hospital environment) for *IS16*. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5 % (w/v) agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels stained with GelRed (Biotium, California, USA) at 90 V for 50 min, and visualized with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad, Madrid, Spain). The molecular size marker used was HyperLadder 50 bp (Bioline GmbH, Germany).

Table V.2. Primers and PCR conditions used in this study.

Genes or PCR-based genotyping methods (Primer reference)	Primer	Sequence 5'-3'	PCR conditions		PCR product length (bp)	PCR conditions reference
<i>esp</i> (Leavis <i>et al.</i> , 2003)	14F	AGATTTCATCTTTGATTCTTGG	95 °C 1 min	1 cycle	Approx. 500	Leavis <i>et al.</i> (2003)
	12R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG	95 °C 15 s			
			52 °C 15 s	35 cycles		
			72 °C 10 s			
<i>hyl_{Em}</i> (Rice <i>et al.</i> , 2003)	Forward	GAGTAGAGGAATATCTTAGC	95 °C 1 min	1 cycle	661	Rice <i>et al.</i> (2003)
	Reverse	AGGCTCCAATTCTGT	95 °C 15 s			
			48 °C 15 s	35 cycles		
			72 °C 10 s			
IS16 (Werner <i>et al.</i> , 2011)	IS16-F	CATGTTCCACGAACCAGAG	95 °C 1 min	1 cycle	547	Werner <i>et al.</i> (2011)
	IS16-R	TCAAAAAGTGGGCTTGCGC	95 °C 15 s			
			53 °C 15 s	35 cycles		
			72 °C 10 s			
RAPD (Huey and Hall, 1989)	M13	GAGGGTGGCGGTTCT	94 °C 5 min	1 cycle	Multiple bands	Hosseini <i>et al.</i> (2009)
			94 °C 1 min			
			45 °C 1 min	33 cycles		
			72 °C 1 min			
ERIC-PCR (Versalovic <i>et al.</i> , 1991)	ERIC-1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	94 °C 3 min	1 cycle	Multiple bands	(Ventura and Zink, 2002)
	ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	94 °C 30 s			
			48 °C 1 min	35 cycles		
			72 °C 5 min			
ARDRA (16S rDNA) (Michel <i>et al.</i> , 2007)	P1	AGAGTTTGATCMTGGCTC	94 °C 5 min	1 cycle	5,000	Michel <i>et al.</i> (2007)
	P2	ACATCGAGGTGCCAAAC	94 °C 30 s			
			57 °C 1 min	30 cycles		
			72 °C 6 min			
			72 °C 7 min	1 cycle		

V.3.3. Determination of ampicillin susceptibility

The susceptibility of the 14 *E. faecium* strains was evaluated using a broth microdilution test (Huys *et al.*, 2011). Individual colonies were suspended in a sterile glass tube containing 5 mL saline solution (0.85% NaCl; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) to a turbidity of 1 in the McFarland scale (approx. 3×10^8 CFU/mL), and further diluted to 6×10^5 CFU/mL in Iso-sensitest (IST) broth (Oxoid) (Klare *et al.*, 2005). Fifty microlitres of the diluted enterococcal suspensions was added to each

microplate well previously loaded with 50 µL of a serial ampicillin (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA) dilution, resulting in a final bacterial concentration of 3×10^5 CFU/mL and a final antibiotic concentration of 0.125 to 16 mg/L. After incubation (37 °C, 18 h), the minimum inhibitory concentration (MIC) was established as the lowest antibiotic concentration that inhibited bacterial growth, and interpreted according to the breakpoint identified by EFSA (2012). *E. faecalis* CECT795 (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain) was used as quality control.

V.3.4. PFGE

PFGE analysis was performed using the methodology described by Descheemaeker *et al.* (1997) and Kelly *et al.* (2010), and unless otherwise stated, all the reagents were obtained from Sigma-Aldrich Corp. PFGE macrorrestriction of purified genomic DNA was carried out at 30 °C for 24 h in a restriction buffer containing 15 U of *Sma*I (Takara, Shiga, Japan). The chromosomal restriction fragments were separated by PFGE in a CHEF DR-II PFGE apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) containing a 1% (w/v) Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) gel. The electrophoresis was performed in an electrophoresis chamber equilibrated at 14 °C at a constant voltage of 6 V/cm² with a ramped pulse time of 1–35 s for 23 h. Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) was used as molecular size standard. The gel was stained with ethidium bromide and visualized with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad, Madrid, Spain).

V.3.5. RAPD

RAPD was performed using the specific oligonucleotide primer and cycling conditions shown in Table 2. PCR-amplifications were performed in 25 µL reaction mixtures with 5 to 50 ng of purified DNA, 0.7 µM of primer, 0.2 mM of each dNTP, buffer 1×, 3 mM MgCl₂ and 0.75 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Madrid, Spain). PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels stained with GelRed (Biotium, California, USA) at 90 V for 90 min and visualized with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad). The molecular size marker used was 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

V.3.6. ERIC-PCR

ERIC-PCR amplifications were performed using the specific oligonucleotide primers and cycling conditions shown in Table 2. PCR-amplifications and PCR-product visualization were carried out as described above.

V.3.7. ARDRA

PCR amplifications were performed using the specific oligonucleotide primers and cycling conditions shown in Table 2. PCR-amplifications were carried out in 50 µL reaction mixtures with 5 to 50 ng of purified DNA, 0.7 µM of each primer, 0.2 mM of each dNTP, buffer 1×, 2 mM MgCl₂ and 1.5 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). The expected PCR-product was analyzed by electrophoresis on 1% (w/v) agarose (Pronadisa) gels stained with GelRed (Biotium) at 90 V for 50 min. Digestion of the amplified product (4 µL) was performed in 20 µL reaction mixtures containing 5 U of the restriction enzyme *HhaI* (New England Biolabs) at 37 °C for 3 h. The restriction fragments patterns obtained after enzyme inactivation (65 °C for 20 min) were analyzed by electrophoresis on 1% (w/v) agarose (Pronadisa) gels at 90 V for 90 min using HyperLadder 50 bp (Bioline GmbH) as molecular size marker. PCR-product visualization were carried out as described above.

V.3.8. Data analysis

The resulting patterns obtained from PFGE-*SmaI* digestion, RAPD, ERIC-PCR and ARDRA-*HhaI* digestion were interpreted after constructing dendrograms using the unweighted-pair group method with arithmetic mean (UPGMA) and the similarity based on the Dice's coefficient analyzed with the Phoretix v.5.0 software (Nonlinear Dynamics Ltd., United Kingdom). The discriminatory power of the technique was evaluated using the Simpson's index of diversity (ID) described by Hunter and Gaston (1988), and calculated from the following equation: $ID = 1 - [1/N (N - 1)] \sum n_j (n_j - 1)$, where N is the total number of strains and n_j is the number of strains belonging to type j. ID values close to 0 or 1 revealed low and high diversity, respectively.

V.4. RESULTS

V.4.1. PCR detection of virulence markers and determination of ampicillin susceptibility

None of the *E. faecium* strains of food origin carried any of the virulence markers *esp*, *hyl_{Efm}* or *IS16* (Table 3). The distribution of MICs for ampicillin is summarized in Table 3.

Table V.3. Virulence markers and ampicillin susceptibility of *E. faecium* strains.

<i>E. faecium</i> strains	Virulence markers	Ampicillin MIC (mg/l) ^a
BNM58	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	1
CV1	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	0.25
CV2	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	0.25
LPP29	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	0.25
SMA7	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	0.5
SMA8	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	0.5
SMF8	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	0.5
TPM76	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	0.25
TPP2	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	0.25
T2	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	≤ 0.125
T29	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	0.5
L50	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	0.5
P13	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	≤ 0.125
T136	<i>esp</i> ⁻ , <i>hyl</i> _{Efm} ⁻ , <i>IS16</i> ⁻	0.5

^aMICs determined by a microdilution test. The ampicillin dilution range was 0.125–16 mg/l. Strains showing a MIC ≤ 2 mg/l were considered as susceptible (EFSA, 2012).

V.4.2. PFGE

PFGE patterns of the 14 *E. faecium* strains showed that 13 were clustered into a major group (G1), separated from *E. faecium* T136 (56% of similarity), with bands of, approximately, 48.5–485.0 Kb (Fig. 5.1). The enterococci from group G1 were further subdivided into three well-defined subgroups (SG1.1 to SG1.3) with a similarity coefficient of 70%. The subgroup SG1.1 was composed by seven *E. faecium* strains (T2, L50, BNM58, SMF8, SMA8, SMA7 and T29), including four enterococci (L50, BNM58, SMF8 and SMA8) that showed identical PFGE patterns. In subgroup SG1.3, five strains (LPP29, TPM76, TPP2, CV2 and CV1) showed 100% of similarity, while subgroup SG1.2 was composed of only one strain (*E. faecium* P13). The resulting index of diversity of PFGE analysis was 0.824.

V.4.3. RAPD

RAPD patterns of the 14 *E. faecium* strains showed that 13 enterococci were clustered into a main group (G1), separated from *E. faecium* SMA7 (16% of similarity), with DNA fragments ranging from, approximately, 650 to 4,000 bp (Fig. 5.2). Moreover, the enterococci in G1 were subdivided into eight subgroups (SG1.1 to SG1.8) with a similarity level of 70%. The subgroup SG1.4 was composed of *E. faecium* BNM58 and SMF8 and the subgroup SG1.8 by five strains (LPP29, TPM76, CV2, CV1 and TPP2). The remaining subgroups (SG1.1, SG1.2, SG1.3, SG1.5, SG1.6 and SG1.7) were composed of only one *E. faecium* strain (T2, T29, L50, SMA8, T136 and P13, respectively). The resulting index of diversity of RAPD analysis was 0.934.

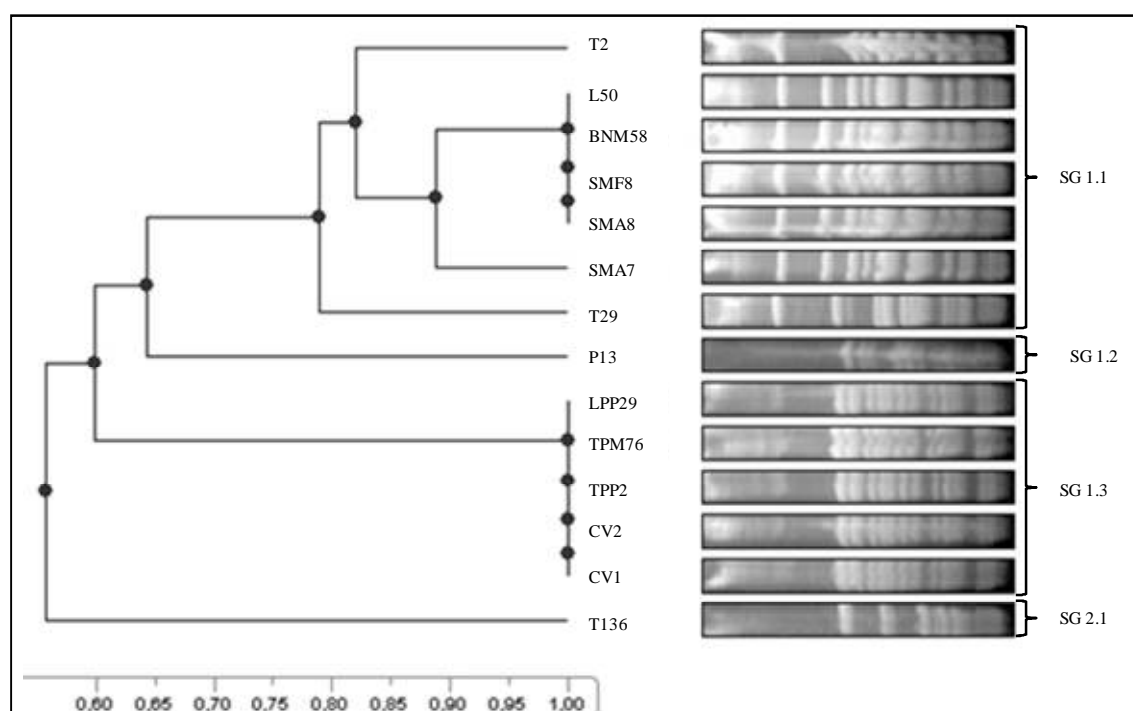


Figure 5.1. Dendrogram of PFGE-*Sma*I digestion patterns showing the genetic relationships amongst the 14 *E. faecium* strains.

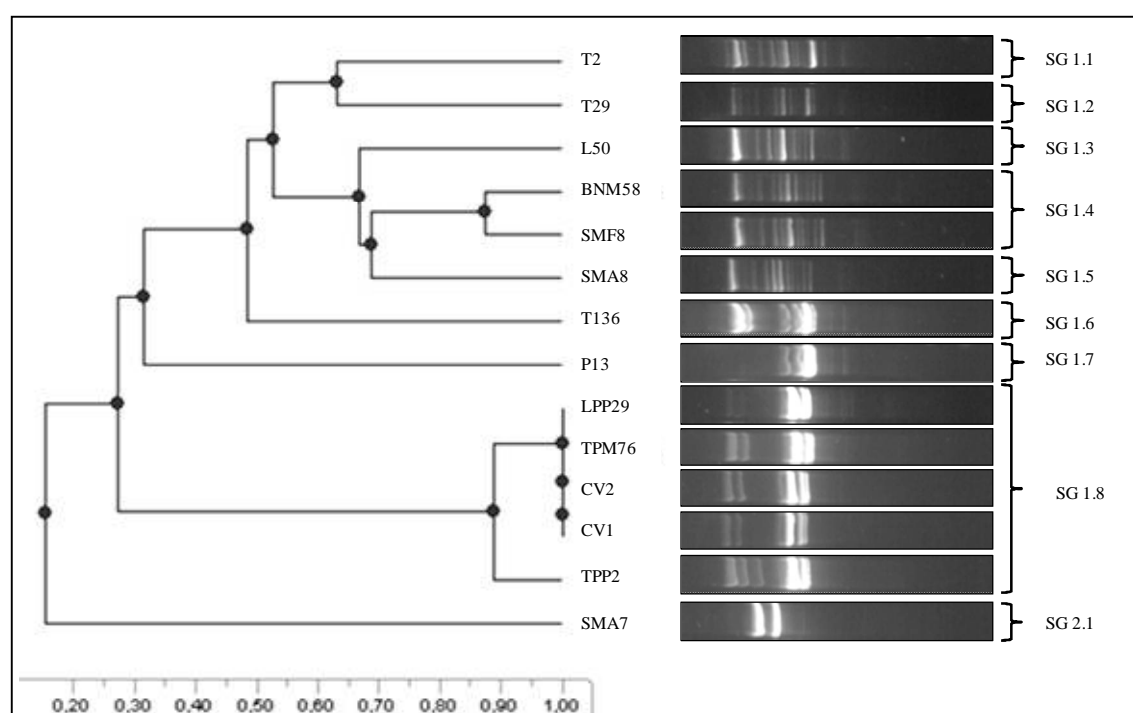


Figure 5.2. Dendrogram of RAPD patterns showing the genetic relationships amongst the 14 *E. faecium* strains.

V.4.4. ERIC-PCR

ERIC-PCR patterns of the 14 *E. faecium* strains showed that 13 enterococci were clustered in a major group (G1), separated from *E. faecium* LPP29 (24% of similarity), with DNA fragments of, approximately, 100–3,000 bp (Fig. 5.3). In addition, all *E. faecium* strains in group G1 were divided into seven subgroups (SG1.1 to SG1.7) with a similarity coefficient of 70%. The subgroups SG1.3, SG1.5 and SG1.7 were composed of four (L50, BNM58, SMF8 and SMA8), three (P13, T136 and TPP2), and two strains (CV2 and CV1), respectively. The remaining subgroups (SG1.1, SG1.2, SG1.4 and SG1.6) were composed of only one strain (T2, T29, SMA7 and TPM76, respectively). The resulting index of diversity of ERIC-PCR analysis was 1.000.

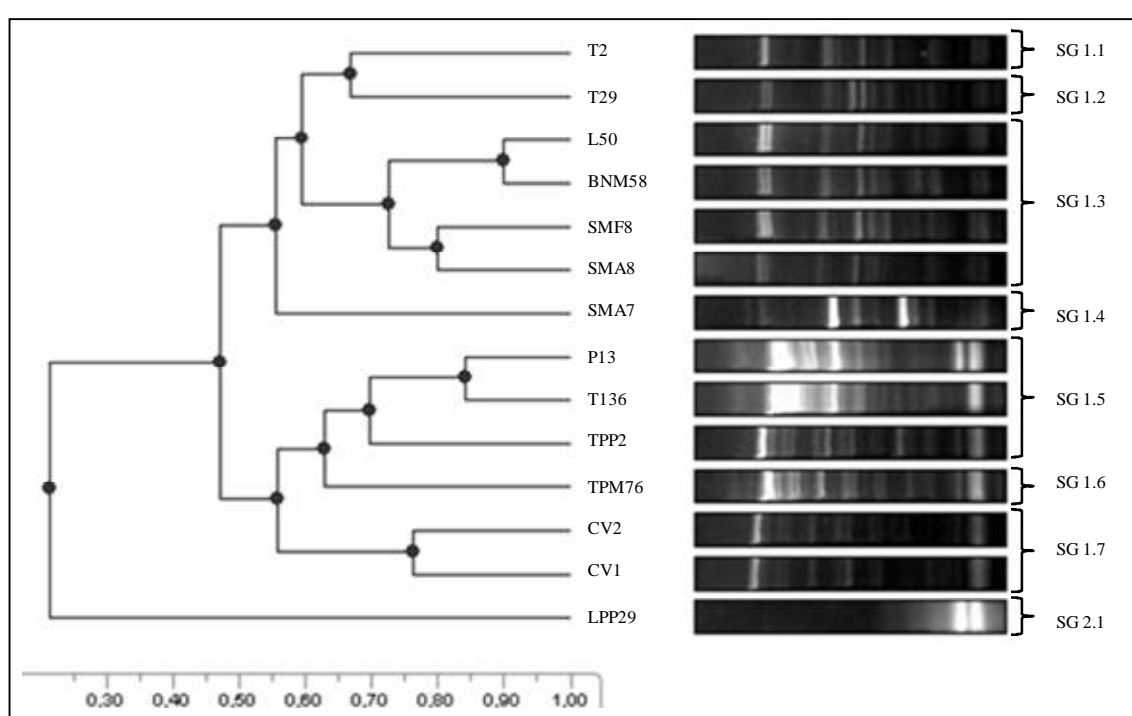


Figure 5.3. Dendrogram of ERIC-PCR patterns showing the genetic relationships amongst the 14 *E. faecium* strains.

V.4.5. ARDRA

ARDRA profiles of the 14 *E. faecium* strains showed the presence of 2 well-defined and highly divergent groups (G1 and G2; 88% of similarity) with DNA fragments ranging from, approximately, 100 to 1,200 bp (Fig. 5.4). The first group (G1) included six *E. faecium* strains (T2, T29, L50, BNM58, SMF8 and SMA8) with identical profiles, and *E. faecium* SMA7 (94% of similarity); however, the second group (G2) was composed of seven *E. faecium* strains (P13, T136, LPP29, TPM76, TPP2, CV2 and CV1) with a similarity of 100%. The resulting index of diversity of ARDRA analysis was 0.604.

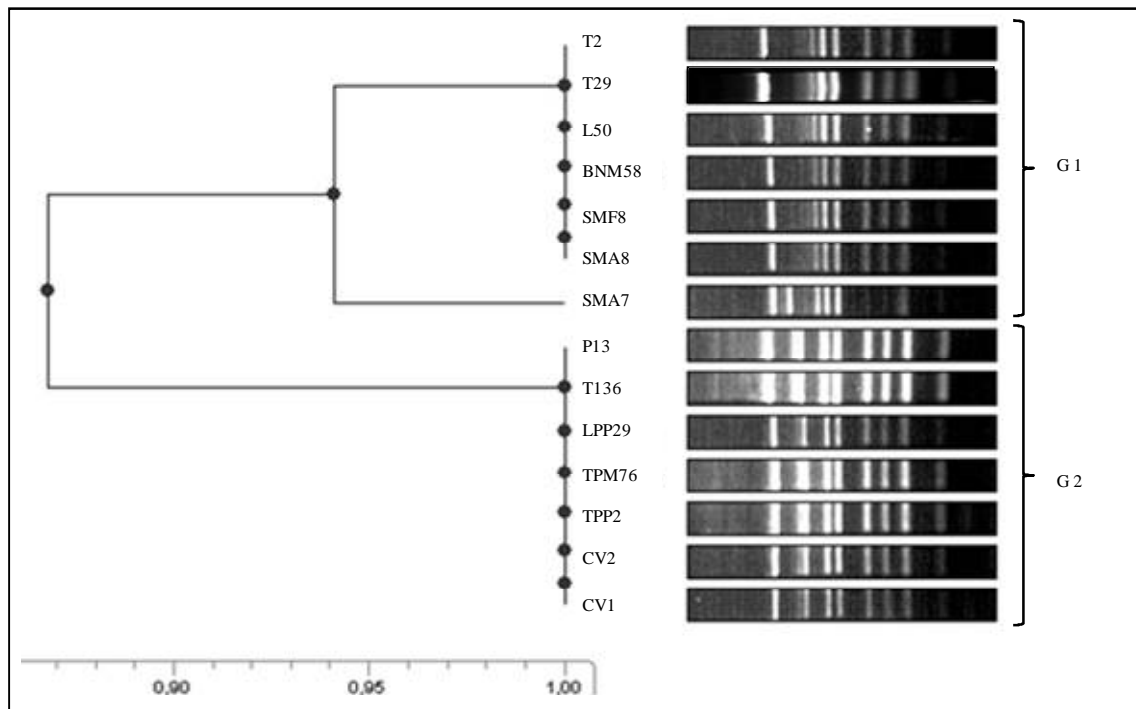


Figure 5.4. Dendrogram of ARDRA-*HhaI* digestion patterns showing the genetic relationships amongst the 14 *E. faecium* strains.

V.5. DISCUSSION

In the last years, the emergence and dissemination of acquired genetic elements, including genes encoding antibiotic resistance and/or virulence factors, amongst clinical *E. faecium* isolates has become a cause of great concern, as well as the possibility of their transmission amongst strains used in the food and feed industry (Arias and Murray, 2012; EFSA, 2012). In this sense, the detection of three virulence marker markers (*esp*, *hyl_{Efm}* or *IS16*) by PCR and the determination of the MIC for ampicillin have been proposed by EFSA (2012) as a method to assess the safety of *E. faecium* and to identify strains potentially linked to nosocomial infections. Therefore, we have assayed the safety of 14 *E. faecium* strains isolated from food in order to identify those safe for use in the food industry or as probiotics in animal nutrition. Our results showed that the tested virulence markers (*esp*, *hyl_{Efm}* or *IS16*) were not found in any of the 14 enterococci, and all *E. faecium* strains were susceptible to ampicillin according to the breakpoint (≤ 2 mg/L) established by EFSA (2012). In previous studies, the mobile *IS16* element (designated as a mutator type transposase) has been proposed as a specific marker to predict hospital-adapted *E. faecium* strains (Leavis *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2011). The absence of *IS16* element amongst our non-clinical enterococci is in agreement with Werner *et al.* (2011), who suggested a host range of *IS16*-bearing plasmids limited to hospital-adapted strains. The gene *esp* has been located on a putative pathogenicity island (Leavis *et al.*, 2004), and recently renamed as integrative conjugative element *ICEEfm1* since it can be mobilized and is self-transmissible (Top *et al.*, 2011). Previous studies have associated its presence in *E. faecium* with biofilm formation (Heikens *et al.*, 2007), urinary tract infection (Leendertse *et al.*, 2009) and endocarditis (Heikens *et al.*, 2011). On

the other hand, *hyl*_{Efm} is carried by large transferable megaplasms in hospital-adapted *E. faecium* strains (Freitas *et al.*, 2010). A previous study reported that the acquisition of *hyl*_{Efm}-plasmid by the non-colonizing *E. faecium* D344SRF from the clinical isolate *E. faecium* C68 promoted its colonization in mice gastrointestinal tract (Rice *et al.*, 2009). In this work, the absence of *esp* and *hyl*_{Efm} in the 14 enterococci may also be related to their non-clinical origin. The lack of these genes is in concordance with a previous study in which none of the *E. faecium* strains commercially used as probiotics harboured any of these virulence factors (Vankerckhoven *et al.*, 2008). Recently, the presence of *esp* and *hyl* has been reported more frequently in ampicillin-resistant vancomycin-resistant *E. faecium* (VREF) than in ampicillin-susceptible VREF strains (Vankerckhoven *et al.*, 2004). In fact, the increase of the occurrence of enterococci implicated in hospitals outbreaks has been mainly attributed to the spread of ampicillin-resistant VREF exhibiting *esp* and/or *hyl* (Klare *et al.*, 2005; Vankerckhoven *et al.*, 2008; Werner *et al.*, 2008).

Molecular genotyping techniques have been mainly employed in epidemiological studies to identify the source of the microorganisms responsible for the infection, to recognize their spreading mode, reservoirs and vectors, and to evaluate specific infection control measures and treatments (Singh *et al.*, 2006). Additionally, these techniques have been evaluated to identify probiotic strains from other bacteria in animal feed (Weiss *et al.*, 2010), and to confirm the capacity of implantation, dominance and survival of inoculated bioprotective strains in fermented food (Rubio *et al.*, 2013). In this study, the relationship amongst the 14 *E. faecium* strains was analyzed by PFGE and three PCR-based methods (RAPD, ERIC-PCR and ARDRA). PFGE has been used as a preferential method for genotyping analysis of *E. faecium* in epidemiological studies (Vankerckhoven *et al.*, 2004; Klare *et al.*, 2005; Werner *et al.*, 2011), but it has been also employed in studies focused on *E. faecium* genetic diversity in food (Jurkovič *et al.*, 2007) and genetic relatedness between clinical isolates and probiotic cultures (Vankerckhoven *et al.*, 2008; Noguchi *et al.*, 2011). Nowadays, several alternative techniques have been successfully applied to the genotyping of enterococci below the species level because they reduce time and costs and only require standard equipment (Werner *et al.*, 2003). In our work, the PFGE analysis of *Sma*I macrorrestriction patterns evidenced four subgroups, whereas RAPD and ERIC-PCR analysis gave nine and eight different subgroups, respectively. Moreover, ERIC-PCR reached the highest values, followed by RAPD and PFGE, while ARDRA achieved the lowest value. The fact that ERIC-PCR was the most discriminating technique is in agreement with the results of Jurkovič *et al.* (2007), who reported that ERIC-PCR was more suitable than PFGE for typing of enterococci from cheeses. Martín-Platero *et al.* (2009) observed that ERIC-PCR and RAPD were useful tools to identify and genotype enterococci isolated from cheeses. Moreover, Weiss *et al.* (2010) reported that RAPD proved the superior discriminatory power for *E. faecium* strains from animal feed in comparison to other PCR-based methods. The lowest discriminatory power obtained for ARDRA is

in agreement with previous works that reported the usefulness of this method to identify bacteria at the species level but not to cluster strains within the same species (Michel *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2010).

In this work, the analysis of the patterns showed a high heterogeneity amongst the enterococci likely due to their different origin, although some relatedness was observed. With regard to this, the PFGE- and ARDRA-patterns of *E. faecium* L50, BNM58, SMF8 and SMA8 showed 100% of similarity, but based on the patterns obtained with RAPD and ERIC-PCR, these strains were less related (67% and 73% of similarity, respectively). The patterns of *E. faecium* LPP29, TPM76, CV2 and CV1 revealed a similarity of 100% when were analyzed by PFGE, RAPD and ARDRA methods, but these strains were poorly related by ERIC-PCR (55% of similarity), with the exception of *E. faecium* CV1 and CV2 that showed a similarity of 75%.

In conclusion, we demonstrated, according to the EFSA guidance on the safety assessment of *E. faecium* (EFSA, 2012), the absence of well-known enterococcal virulence markers in a collection of 14 *E. faecium* strains of food origin, which renders them safe to be used in the food industry or as probiotics in animal production. Moreover, our results indicated the reliability of ERIC-PCR for genotyping enterococci and, very likely, for their specific monitoring.

VI.6. REFERENCES

- Almeida, T., A. Brandão, E. Muñoz-Atienza, A. Gonçalves, C. Torres, G. Igrejas, P. E. Hernández, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. Poeta. 2011. Identification of bacteriocin genes in enterococci isolated from game animals and saltwater fish. *J. Food Prot.*, 74: 1252–1260.
- Araújo, C., C. Torres, A. Gonçalves, C. Carneiro, M. López, H. Radhouani, M. Pardal, G. Igrejas, and P. Poeta. 2011. Genetic detection and multilocus sequence typing of vanA-containing *Enterococcus* strains from mullets fish (*Liza ramada*). *Microb. Drug Resist.*, 17: 357–361.
- Araújo, C., E. Muñoz-Atienza, Y. Nahuelquín, P. Poeta, G. Igrejas, P. E. Hernández, C. Herranz, and L. M. Cintas. 2015. Inhibition of fish pathogens by the microbiota from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and rearing environment. *Anaerobe*, 32: 7–14.
- Arias, C. A., and B. E. Murray. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 10: 266–278.
- Casaus, P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143: 2287–2294.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havårstein, P. E. Hernández, and I. F. Nes. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4321–4330.

- Descheemaeker, P., C. Lammens, B. Pot, P. Vandamme, and H. Goossens.** 1997. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 555–561.
- Eaton, T. J., and M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1628–1635.
- EFSA.** 2012. Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA J.*, 10: 2682.
- Freitas, A. R., A. P. Tedim, C. Novais, P. Ruiz-Garbajosa, G. Werner, J. A. Laverde-Gómez, R. Cantón, L. Peixe, F. Baquero, and T. M. Coque.** 2010. Global spread of the *hlyEfm* colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54: 2660–2665.
- Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 163–171.
- Gomes, B. C., C. T. Esteves, I. C. Palazzo, A. L. Darini, G. E. Felis, L. A. Sechi, B. D. Franco, and E. C. De Martinis.** 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.*, 25: 668–675.
- Heikens, E., M. J. Bonten, and R. J. Willems.** 2007. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J. Bacteriol.*, 189: 8233–8240.
- Heikens, E., K. V. Singh, K. D. Jacques-Palaz, M. van Luit-Asbroek, E. A. Oostdijk, M. J. Bonten, B. E. Murray, and R. J. Willems.** 2011. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. *Microbes Infect.*, 13: 1185–1190.
- Hosseini, S. V., S. Arlindo, K. Böhme, C. Fernández-No, P. Calo-Mata, and J. Barros-Velázquez.** 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *J. Appl. Microbiol.*, 107: 1392–1403.
- Huey, B., and J. Hall.** 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.*, 171: 2528–2532.
- Hunter, P. R., and M. A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 2465–2466.
- Huys, G., K. D'Haene, M. Cnockaert, L. Tosi, M. Danielsen, A. B. Flórez, J. Matto, L. Axelsson, J. Korhonen, S. Mayrhofer, M. Egervärn, M. Giacomini, and P. Vandamme.** 2011. Intra- and interlaboratory performances of two commercial antimicrobial susceptibility testing methods for bifidobacteria and nonenterococcal lactic acid bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 2567–2574.
- Jurkovič, D., L. Križková, M. Sojka, M. Takáčová, R. Dušinský, J. Krajčovič, P. Vandamme, and M. Vancanneyt.** 2007. Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 116: 82–87.
- Kelly, W. J., L. J. Ward, and S. C. Leahy.** 2010. Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. *Genome Biol. Evol.*, 2: 729–744.
- Klare, I., C. Konstabel, S. Mueller-Bertling, G. Werner, B. Strommenger, C. Kettlitz, S. Borgmann, B. Schulte, D. Jonas, A. Serr, A. M. Fahr, U. Eigner, and W. Witte.** 2005. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hly* in German hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 24: 815–825.

- Leavis, H., J. Top, N. Shankar, K. Borgen, M. Bonten, J. van Embden, and R. J. Willems.** 2004. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J. Bacteriol.*, 186: 672–682.
- Leavis, H. L., R. J. Willems, J. Top, E. Spalburg, E. M. Mascini, A. C. Fluit, A. Hoepelman, A. J. de Neeling, and M. J. Bonten.** 2003. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 1108–1115.
- Leavis, H. L., R. J. Willems, W. J. van Wamel, F. H. Schuren, M. P. Caspers, and M. J. Bonten.** 2007. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathog.*, 3: e7.
- Leendertse, M., E. Heikens, L. M. Wijnands, M. van Luit-Asbroek, G. J. Teske, J. J. Roelofs, M. J. Bonten, T. van der Poll, and R. J. Willems.** 2009. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice. *J. Infect. Dis.*, 200: 1162–1165.
- Martín-Platero, A. M., E. Valdivia, M. Maqueda, and M. Martínez-Bueno.** 2009. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, 132: 24–32.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2006. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of Enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.*, 69: 520–531.
- Michel, C., C. Pelletier, M. Boussaha, D. G. Douet, A. Lautraite, and P. Tailliez.** 2007. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 2947–2955.
- Muñoz-Atienza, E., B. Gómez-Sala, C. Araújo, C. Campanero, R. del Campo, P. E. Hernández, C. Herranz, and L. M. Cintas.** 2013. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol.*, 13: 15.
- Noguchi, N., H. Nakaminami, K. Nakase, and M. Sasatsu.** 2011. Characterization of *Enterococcus* strains contained in probiotic products. *Biol. Pharm. Bull.*, 34: 1469–1473.
- Ogier, J. C., and P. Serror.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 291–301.
- Rice, L. B., L. Carias, S. Rudin, C. Vael, H. Goossens, C. Konstabel, I. Klare, S. R. Nallapareddy, W. Huang, and B. E. Murray.** 2003. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J. Infect. Dis.*, 187: 508–512.
- Rice, L. B., V. Laktičová, L. L. Carias, S. Rudin, R. Hutton, and S. H. Marshall.** 2009. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. *J. Infect. Dis.*, 199: 342–349.
- Rubio, R., S. Bover-Cid, B. Martín, M. Garriga, and T. Aymerich.** 2013. Assessment of safe enterococci as bioprotective cultures in low-acid fermented sausages combined with high hydrostatic pressure. *Food Microbiol.*, 33: 158–165.
- Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L. M. Cintas, and P. E. Hernández.** 2007. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.*, 117: 295–305.

- Singh, A., R. V. Goering, S. Simjee, S. L. Foley, and M. J. Zervos.** 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 19: 512–530.
- Top, J., J. C. Sinnige, E. A. Majoor, M. J. Bonten, R. J. Willems, and W. van Schaik.** 2011. The recombinase IntA is required for excision of *esp*-containing ICE f_{ml} in *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.*, 193: 1003–1006.
- Vankerckhoven, V., T. Van Autgaerden, C. Vael, C. Lammens, S. Chapelle, R. Rossi, D. Jabes, and H. Goossens.** 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 4473–4479.
- Vankerckhoven, V., G. Huys, M. Vancanneyt, C. Snauwaert, J. Swings, I. Klare, W. Witte, T. Van Autgaerden, S. Chapelle, C. Lammens, and H. Goossens.** 2008. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 4247–4255.
- Ventura, M., and R. Zink.** 2002. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 217: 141–154.
- Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 19: 6823–6831.
- Weiss, A., K. J. Domig, W. Kneifel, and H. K. Mayer.** 2010. Evaluation of PCR-based typing methods for the identification of probiotic *Enterococcus faecium* strains from animal feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 158: 187–196.
- Werner, G., R. J. Willems, B. Hildebrandt, I. Klare, and W. Witte.** 2003. Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 1499–1506.
- Werner, G., T. M. Coque, A. M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K. G. Kristinsson, R. Leclercq, C. H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L. V. Peixe, E. Sadowy, G. S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R. J. Willems, W. Witte, and N. Woodford.** 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.*, 13: 1–11.
- Werner, G., C. Fleige, U. Geringer, W. van Schaik, I. Klare, and W. Witte.** 2011. IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infect. Dis.*, 11: 80.

CAPÍTULO VI

**Actividad antimicrobiana y efecto de bacterias lácticas
de origen acuático en la protección de *Artemia franciscana*
frente a *Vibrio campbellii* empleando ensayos de exposición
de cultivos gnotobióticos**

CHAPTER VI

***Antimicrobial activity and effect of Lactic Acid Bacteria
of aquatic origin on the protection of Artemia franciscana
against Vibrio campbellii using gnotobiotic challenge tests***

Manuscrito en preparación para su envío

a Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

VI.1. ABSTRACT

The intensive system used in marine aquaculture to produce high levels of fish and shellfish larvae (larviculture) and their live feed (*e.g.*, *Artemia* spp.) can facilitate the proliferation of pathogenic bacteria which may cause high mortality rates and, therefore, elevated economic losses in this sector. In this respect, *Vibrio campbellii* has been found to be associated with luminescent vibriosis in diseased shrimp and crabs. In larviculture, the use of probiotics has been proposed to control bacterial diseases caused by the spread of pathogens through live feed (*e.g.*, *Artemia* spp.) and to maintain a healthy microbial environment in the larvae rearing tanks. Therefore, the aim of the present study was to determine *in vitro* and *in vivo* the probiotic properties of Lactic Acid Bacteria (LAB) previously isolated from fish, seafood and fish products for use in larviculture, including (i) the antimicrobial activity against the pathogen *V. campbellii* on solid media and in co-cultures, (ii) the survival in seawater, and (iii) the *in vivo* effect of heat-inactivated and viable LAB on the protection of *Artemia franciscana* against *V. campbellii* using four different gnotobiotic challenge tests. From a total of 33 LAB, 24 (72.7%) and 31 (93.9%) exerted direct antimicrobial activity against *V. campbellii* LMG21363 in Tryptone Soya Agar (TSA) supplemented with glucose (0.25 and 0.60%, w/v, respectively). After 24 h of incubation in co-culture, 26 out of 33 LAB (78.8%) were bactericidal against *V. campbellii* LMG21363. Namely, 21 out of 33 LAB (63.3%) totally inhibited the growth of *V. campbellii* LMG21363 (5–6 log decrease), while five out of 33 LAB (15.2%) reduced significantly the counts of this pathogen (2–4 log decrease). Moreover, all LAB survived in seawater at 28 °C for 48 h. In the gnotobiotic challenge tests, only heat-inactivated and viable *E. faecium* CV1 and heat-inactivated *L. cremoris* SMF161 significantly enhanced the survival of the infected nauplii (54, 48 and 54%, respectively) in filtered and autoclaved seawater (FASW) (experiment 1) with respect to infected nauplii in the absence of LAB (24%) ($p < 0.05$). When the effect of LAB was evaluated in FASW supplemented with glucose (experiment 2), *A. franciscana* mortality increased in a glucose concentration-dependent manner in all infected animals, probably due to the oxygen starvation caused by the oxidative metabolism of glucose by *V. campbellii* LMG21363. When the effect of LAB was evaluated in FASW supplemented with de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (experiment 3), none of the LAB showed a detrimental effect on *A. franciscana*. Moreover, only heat-inactivated *L. cremoris* SMF161 showed a positive effect on *A. franciscana* survival when nauplii were previously cultured with this strain in FASW supplemented with MRS and then infected with *V. campbellii* ($p < 0.05$). In the experiment 4, the effect of different LAB grouped in pools on the protection of *A. franciscana* was determined in FASW. Only one out of the five groups of heat-inactivated and viable LAB, in which the strains *E. faecium* CV1 and *L. cremoris* SMF161 were included, improved *A. franciscana* survival (42 and 40.7%, respectively; $p < 0.05$). In conclusion, our data suggest that *E. faecium* CV1 and *L. cremoris* SMF161 could improve artemia nutritional status and/or that some molecule(s) could stimulate the innate immune response of *A. franciscana* and enhance its survival against *V. campbellii*,

although further studies need to be carried out using improved *A. franciscana* nutrition conditions (e.g., by supplementation with yeast) in an attempt to enhance LAB probiotic effects related to the protection of *A. franciscana* against this pathogen.

Keywords: *Artemia franciscana*, *Vibrio campbellii*, probiotics, Lactic Acid Bacteria, antimicrobial activity, co-cultures, gnotobiotic challenge tests.

VI.2. INTRODUCTION

The intensive system used in marine aquaculture to produce high levels of fish and shellfish larvae (larviculture) and their live feed (e.g., *Artemia* spp.) can facilitate the proliferation of pathogenic bacteria which may cause high mortality rates and, therefore, elevated economic losses in this sector (Sorgeloos *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2006a). It has been reported that the brine shrimp *Artemia* spp. (*Artemia franciscana* and *Artemia salina*), frequently used as diet in hatcheries of different species (Lavens and Sorgeloos, 2000), may transfer bacteria to fish and shellfish larvae during start-feeding (Verschuere *et al.*, 1997; Olafsen, 2001; Vaseeharan and Ramasamy, 2003). Vibriosis, caused by *Vibrio* spp., is the most important disease in aquaculture-reared animals, including fish, crustaceans, mollusks and corals (Gómez-Gil *et al.*, 2004). The species associated with this disease include *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Listonella anguillarum* (formerly *Vibrio anguillarum*), *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio splendidus* (Saulnier *et al.*, 2000; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2004; Defoirdt *et al.*, 2007b; Chatterjee and Haldar, 2012). In this sense, *V. campbellii* is widely distributed in the marine environment, being associated with luminescent vibriosis in diseased shrimp and crabs (Hameed *et al.*, 1996; Gómez-Gil *et al.*, 2004; Defoirdt *et al.*, 2007b; Phuoc *et al.*, 2008; Thibodeaux *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). With regard to this, the pathogenicity of *V. campbellii* has been also demonstrated using *in vivo* challenge tests in *Artemia franciscana* (Soto-Rodríguez *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2005; Defoirdt *et al.*, 2006, 2008), *Litopenaeus vannamei* (Soto-Rodríguez *et al.*, 2006), and *Callinectes sapidus* (Thibodeaux *et al.*, 2009).

Antibiotics have been widely used in aquaculture for therapeutic and prophylactic purposes, which has prompted the emergence of antibiotic (multi)resistances in bacterial pathogens including *Vibrio* spp., rendering these compounds ineffective to control, amongst other diseases, luminiscent vibriosis (Karunasagar *et al.*, 1994; Teo *et al.*, 2000; FAO, 2005; Cabello, 2006; Jun *et al.*, 2012). In order to avoid the spread of antibiotic-resistant pathogens in fish and the surrounding environment and to increase larvae survival, several alternatives have been suggested, including the use of green-water techniques, vaccines, probiotics, prebiotics, immunostimulants, bacteriophages, short-chain fatty acids, polyhydroxyalkanoates, and quorum sensing disruption (Sakai, 1999; Verschuere *et al.*, 2000b;

Papandroulakis *et al.*, 2001; Sommerset *et al.*, 2005; Vine *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008b; Yousefian and Amiri, 2009; Nayak, 2010; Defoirdt *et al.*, 2011). In larviculture, the use of probiotics has been proposed to control bacterial diseases caused by the spread of pathogens through the live feed (*e.g.*, *Artemia* spp.) and to maintain a healthy microbial environment in the rearing tanks (Marques *et al.*, 2006c). In this sense, gnotobiotic aquatic animals have been employed to study the mode of action of bacteria with the potential to be used as probiotics in larviculture (Verschuere *et al.*, 1999, 2000a; Orozco-Medina *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2005, 2006b). Namely, one of the model aquatic animals used to study host-probiotic interactions is *A. franciscana*, since this organism can be easily cultured in gnotobiotic conditions and is commonly used as vector for the transfer of probiotics to target larvae (Marques *et al.*, 2006a). Indeed, several bacteria belonging to the species *Aeromonas hydrophila* and to the genera *Vibrio*, *Moraxella*, *Kurthia*, *Cytophaga*, *Microbacterium*, and *Exiguobacterium* have been proposed as probiotics based on the results obtained on *A. franciscana* survival and growth in the presence and absence of pathogenic bacteria (*V. campbellii*, *V. proteolyticus* and *V. parahaemolyticus*) using gnotobiotic challenge tests (Verschuere *et al.*, 1999, 2000a; Orozco-Medina *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2005, 2006b). Moreover, other studies have tested Lactic Acid Bacteria (LAB) in artemia cultures (Villamil *et al.*, 2003; Lamari *et al.*, 2014). In this respect, it has been reported that *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei* reduced *V. alginolyticus* load in artemia cultures (Villamil *et al.*, 2003), and that several LAB are able to protect nutrient-enriched *A. franciscana* cultures against *V. alginolyticus* after nutrient enrichment (Lamari *et al.*, 2014). However, according to our knowledge, the effect of LAB on the protection of *Artemia* spp. against *V. campbellii* has not been previously reported. The aim of the present study was to determine *in vitro* and *in vivo* the probiotic properties of 33 LAB previously isolated from fish, seafood and fish products for use in larviculture, including (i) the antimicrobial activity against the pathogen *V. campbellii* on solid media and in co-cultures, (ii) the survival in seawater, and (iii) the *in vivo* effect of heat-inactivated and viable LAB on the protection of *Artemia franciscana* against *V. campbellii* using four different gnotobiotic challenge tests.

VI.3. MATERIALS AND METHODS

VI.3.1. Bacterial strains and growth conditions

A total of 33 LAB previously isolated from fish, seafood and fish products intended for human consumption (Table VI.1) (Gómez-Sala *et al.*, 2004) were selected for this study according to their safety (Muñoz-Atienza *et al.*, 2013a). LAB were aerobically grown in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid, Ltd., Hampshire, England) at 30 °C. *V. campbellii* LMG21363 (Laboratory of Microbiology Collection, Ghent University, Ghent, Belgium) was grown on marine broth (Difco, BD Diagnostic Systems, Michigan, USA) with 1.5% (w/v) agar (Pronadisa, Madrid, Spain) (MA) at 28 °C.

For obtaining liquid cultures, individual colonies from the MA plates were incubated in marine broth at 28 °C with shaking (100 rpm) for 8 h.

VI.3.2. Direct antimicrobial activity

The direct antimicrobial activity of the 33 LAB against *V. campbellii* LMG21363 was determined by the spot-on-agar test (SPAT) (Cintas *et al.*, 1998a). Briefly, 5 µl of each overnight LAB culture (30 °C, 16 h) was spotted onto Tryptone Soya Agar (TSA; Oxoid) plates and TSA supplemented with 0.25–0.60% (w/v) glucose (Panreac Química S.L.U., Barcelona, Spain) (TSA-G). After incubation at 30 °C for 24 h, 40 ml of Tryptone Soya Broth (Oxoid) supplemented with 1% (w/v) NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (TSB-N) containing approx. 1×10^5 cfu/ml of the pathogen was poured over the plates. After incubation at 28 °C for 16–24 h, the plates were checked for inhibition zones (absence of visible microbial growth around the spotted cultures), and only inhibition halos with diameters above 8 mm were considered positive.

VI.3.3. Extracellular antimicrobial activity

The extracellular antimicrobial activity of cell-free supernatants from the 33 LAB cultures grown in MRS broth at 30 °C for 16 h against *V. campbellii* LMG21363 was determined by the agar well-diffusion test (ADT) (Cintas *et al.*, 1995). Supernatants were obtained by centrifugation of cultures at $10,000 \times g$ at 4 °C for 10 min and filter-sterilization through 0.22 µm-pore-size filters (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA), and then stored at –20 °C until use. Fifty-µl aliquots of supernatants were placed into wells (6-mm diameter) cut in cooled agar (0.8%, w/v) previously seeded with the indicator microorganism (1×10^5 cfu/ml). To determine the nature of the antimicrobial compounds, the supernatants showing antimicrobial activity were treated as follows: (i) pH-adjustment to 6.2 with 1 M sodium hydroxide (NaOH; Panreac Química S.L.U.) and filter-sterilization through 0.22 µm-pore-size filters; (ii) proteinase K treatment (10 mg/ml) (AppliChem GmbH, Germany) at 37 °C for 2 h and enzyme inactivation by heat treatment (100 °C, 10 min), and (iii) heat treatment (100 °C, 10 min). After treatments, samples were assayed for residual antimicrobial activity by an ADT as described above.

VI.3.4. Co-culture assays

The co-culture assays were performed by inoculating each of the the 33 LAB (1×10^5 cfu/ml) together with *V. campbellii* LMG21363 (1×10^3 cfu/ml) in 20 ml of TSB-N supplemented with 0.60% (w/v) glucose (TSB-NG) (Hai *et al.*, 2007) and incubating at 28 °C. Samples taken at 0, 12 and 24 h were serially diluted in sterile saline solution (NaCl 0.9%, w/v) and viable counts of *V. campbellii* LMG21363 were determined by plating on Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose agar (TCBS; Oxoid)

(28 °C, 24 h) in triplicate. Additionally, pH values of the co-cultures were determined at the same time points. *V. campbellii* LMG21363 inoculated (1×10^3 cfu/ml) in 20 ml of TSB-NG in the absence of LAB was used as growth control.

VI.3.5. Survival in seawater

For determining the survival of the 33 LAB in seawater, cultures obtained grown in MRS broth at 30 °C for 16 h were first centrifuged at $6000 \times g$ at 4 °C for 5 min. Bacterial pellets were then washed twice with sterile phosphate saline buffer (PBS; pH 7.2) and resuspended in the same buffer. LAB were inoculated (1×10^5 cfu/ml) in sterile tubes containing 10 ml of filtered (0.22 µm) and autoclaved (121 °C, 15 min) seawater (FASW) and incubated at 28 °C for 48 h. After incubation, samples were serially diluted in sterile PBS and viable counts were determined by plating on MRS agar (1.5%, w/v) (30 °C, 24–48 h) in triplicate.

VI.3.6. Axenic hatching of *A. franciscana*

Axenic hatching of *A. franciscana* nauplii (Fig. 6.1) was performed according to the methodology described by Baruah *et al.* (2010). Firstly, 60 mg of *A. franciscana* high quality hatching cysts (EG® Type, batch 6940; INVE Aquaculture, Baasrode, Belgium) were hydrated in 9 ml of distilled water for 1 h. From this point, manipulations were carried out under a laminar flow hood using autoclaved material. Sterile cysts and nauplii were obtained via decapsulation by adding 330 µl NaOH (30%, v/v) (VWR International S.A.S, Briare, France) and 5 ml sodium hypochlorate (NaOCl; 14%, v/v; VWR International S.A.S) to the hydrated cyst suspension. During the reaction, 0.22 µm filtered aeration was provided. Decapsulation was stopped after 2 min by adding 5 ml sodium thiosulfate (Na₂S₂O₃; 10 g/l; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Then, aeration was stopped and the decapsulated cysts were washed with FASW. Finally, the cysts were resuspended in a 50-ml plastic tube containing 30 ml of FASW and hatched at 28 °C for 28 h in a rotor (4 rpm) with constant illumination (2,000 lux approximately) to allow the emerged nauplii to reach the stage II in which they are able to ingest bacteria.

VI.3.7. *A. franciscana* gnotobiotic challenge tests

Gnotobiotic challenge tests (Fig.6.1) were performed using the methodology described by Baruah *et al.* (2010). Briefly, after hatching of *A. franciscana*, groups of 30 nauplii were transferred to sterile 40-ml glass tubes containing 30 ml of FASW. LAB and *V. campbellii* LMG21363 were grown in MRS (30 °C, 16 h) and marine (28 °C, 8 h) broth, respectively. Heat-inactivated (121 °C, 15 min) and viable bacterial cultures were harvested by centrifugation ($2,200 \times g$, 15 min), and the pellets were

resuspended in 20 ml FASW. The concentrations of the bacterial suspensions were determined by measuring their optical density (OD₅₅₀), assuming that an OD₅₅₀ of 1.0 corresponds to 1.2×10^9 cfu/ml, according to the McFarland standard (BioMerieux, Marcy L'Etoile, France). Heat-inactivated and viable LAB were added (1×10^7 cfu/ml) to the nauplii cultures. After incubation on the above mentioned rotor at 28 °C for 6 h, *V. campbellii* LMG21363 was added (1×10^7 cfu/ml). The glass tubes were put back on the rotor and kept at 28 °C and the survival of *A. franciscana* was scored 36 h after inoculation of the pathogen. *A. franciscana* cultures and pathogen cultures were used as survival and mortality controls, respectively. All manipulations were carried out under a laminar flow hood. Each treatment was performed in quintuplicate.

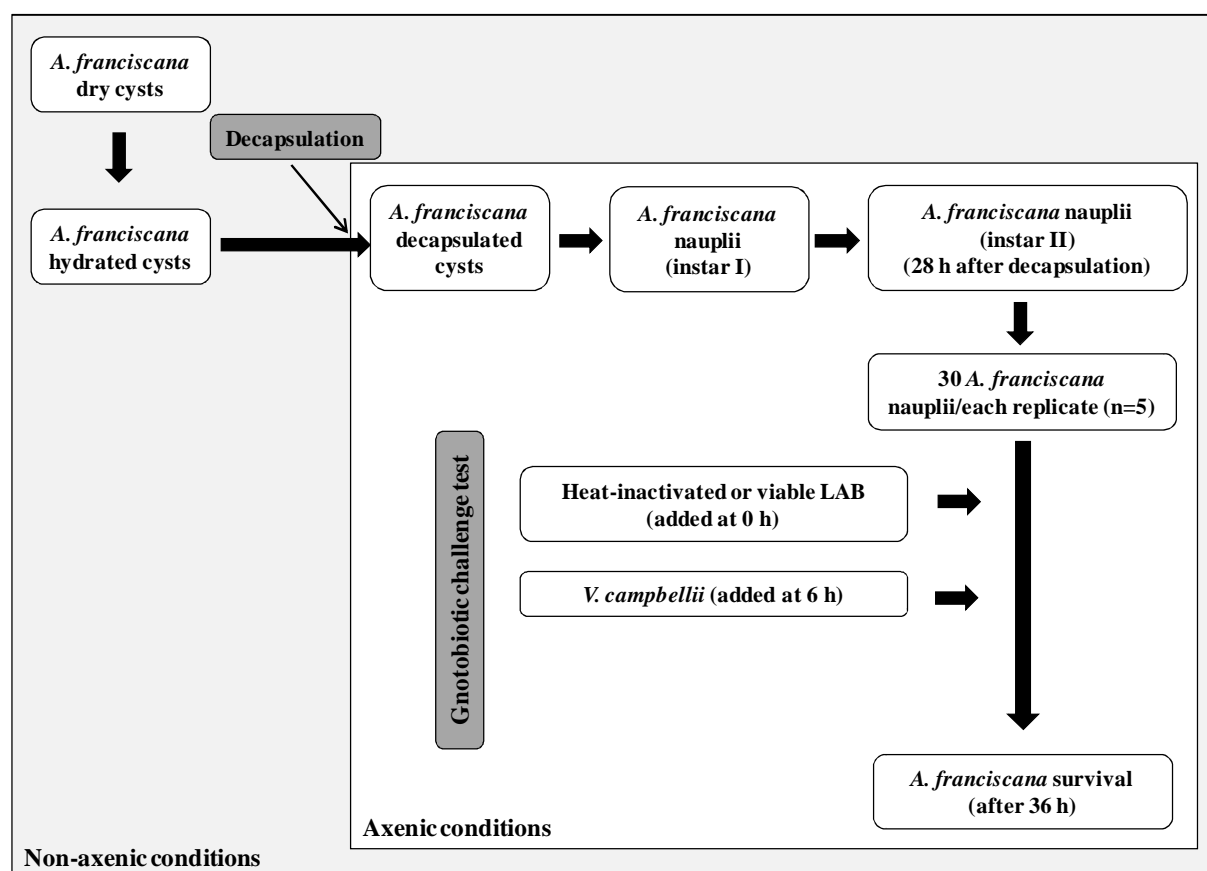


Figure 6.1. Methodology to obtain axenic *A. franciscana* nauplii and experimental design of gnotobiotic challenge tests.

VI.3.7.1. Experimental design

In this work, four different gnotobiotic challenge test designs were used (Table VI.2). In the experiment 1, the effect of eight individual heat-inactivated and viable LAB was tested on *A. franciscana* nauplii challenged with *V. campbellii* LMG21363 and cultured in FASW. In the experiment 2, the effect of two individual heat-inactivated and viable LAB was tested on *A. franciscana* nauplii challenged with *V. campbellii* LMG21363 and cultured in FASW supplemented

with glucose (0.01–0.1%). In the experiment 3, the effect of two individual heat-inactivated and viable LAB was tested on *A. franciscana* nauplii cultured in FASW-MRS broth (1:1). After incubation, nauplii were washed in FASW, challenged with *V. campbellii* LMG21363 and cultured in FASW. In the experiment 4, the effect of 5 pools of 4–5 heat-inactivated or viable LAB was tested on *A. franciscana* nauplii challenged with *V. campbellii* LMG21363 and cultured in FASW. LAB pool number 5 included three bacteriocin-producing LAB strains, namely *E. faecium* L50 (enterocin L50A and enterocinL50B, enterocin P, and enterocin Q producer), *L. lactis* BB24 (nisin A producer), and *P. acidilactici* 347 (pediocin PA-1 producer), previously isolated by our research group (Cintas *et al.*, 1998b, 2000d).

Table VI.1. Experimental designs for the *A. franciscana* gnotobiotic challenge tests^a.

Experiments	28 h after decapsulation	6 h after feeding with LAB	36 h after challenging with <i>V. campbellii</i> (harvest)
Experiment 1			
Control	WB (FASW)	→	→
<i>V. campbellii</i> LMG21363	WB (FASW)	→ VC (FASW)	→
Heat-inactivated LAB + <i>V. campbellii</i> LMG21363	B (FASW)	→ VC (FASW)	→
Viable LAB + <i>V. campbellii</i> LMG21363	B (FASW)	→ VC (FASW)	→
Experiment 2			
Control	WB (FASW + G)	→	→
<i>V. campbellii</i> LMG21363	WB (FASW + G)	→ VC (FASW + G)	→
Heat-inactivated LAB + <i>V. campbellii</i> LMG21363	B (FASW + G)	→ VC (FASW + G)	→
Viable LAB + <i>V. campbellii</i> LMG21363	B (FASW + G)	→ VC (FASW + G)	→
Control (b)	WB (FASW)	→	→
<i>V. campbellii</i> LMG21363 (b)	WB (FASW)	→ VC (FASW)	→
Experiment 3A			
Control	WB (FASW + MRS)	→	→
<i>V. campbellii</i> LMG21363	WB (FASW + MRS)	→ VC (FASW)	→
Heat-inactivated LAB	B (FASW + MRS)	→	→
Heat-inactivated LAB + <i>V. campbellii</i> LMG21363	B (FASW + MRS)	→ VC (FASW)	→
Control (b)	WB (FASW)	→	→
<i>V. campbellii</i> LMG21363 (b)	WB (FASW)	→ VC (FASW)	→
Experiment 3B			
Control	WB (FASW + MRS)	→	→
<i>V. campbellii</i> LMG21363	WB (FASW + MRS)	→ VC (FASW)	→
Viable LAB	B (FASW + MRS)	→	→
Viable LAB + <i>V. campbellii</i> LMG21363	B (FASW + MRS)	→ VC (FASW)	→
Control (b)	WB (FASW)	→	→
<i>V. campbellii</i> LMG21363 (b)	WB (FASW)	→ VC (FASW)	→
Experiment 4			
Control	WB (FASW)	→	→
<i>V. campbellii</i> LMG21363	WB (FASW)	→ VC (FASW)	→
Heat-inactivated LAB pool + <i>V. campbellii</i> LMG21363	B (FASW)	→ VC (FASW)	→
Viable LAB pool + <i>V. campbellii</i> LMG21363	B (FASW)	→ VC (FASW)	→

^aWB, without bacteria; B, LAB strain; VC, *V. campbellii* LMG21363; FASW, filtered (0.22 µm) and autoclaved (121 °C, 15 min) seawater; G, glucose (0.01 or 0.1%); MRS, de Man, Rogosa and Sharpe broth.

VI.3.8. Statistical analysis

Results of the co-culture experiments were analyzed by the Student's *t* test to determine the differences between each treatment and the control group. Results of *A. franciscana* nauplii survival were analyzed by the one-way ANOVA test to determine significant differences between treatments, followed by Duncan's multiple range tests as a *post hoc* comparison. All statistical analyses were performed using the Statgraphics Plus v.5.1 program and the significant level was accepted at $p < 0.05$.

VI.4. RESULTS

VI.4.1. Antimicrobial activity of LAB from fish, seafood and fish products

None of the 33 LAB evaluated in this work showed antimicrobial activity against *V. campbellii* LMG21363 in TSA without glucose; however, most of the strains exerted direct antimicrobial activity against this pathogen in TSA-G, being the maximum antimicrobial activity obtained at 0.60% (wt/v) glucose (Table VI.2). From the tested strains, 24 (72.7%) and 31 (93.9%) displayed antimicrobial activity against *V. campbellii* LMG21363 in TSA-G (0.25 and 0.60% [wt/v] glucose, respectively). On the other hand, supernatants from 31 out the 33 LAB (93.9%) inhibited the growth of *V. campbellii* LMG21363 (results not shown). The antimicrobial activity of the supernatants withstood proteinase K and heat treatments, but disappeared after pH-adjustment to pH 6.2.

VI.4.2. Co-cultures of LAB and *V. campbellii*

Growth of *V. campbellii* LMG21363 in co-culture with LAB for 12 h was similar to that of the control (10^7 – 10^8 cfu/ml), except for the strains *E. faecium* SMA7, CV2 and TPM76 and *L. cremoris* SMF161 and SMF166, which reduced significantly the growth of this pathogen to 10^5 – 10^6 cfu/ml ($p < 0.05$; $p < 0.01$) (Table VI.2). After 24 h of incubation in co-culture, 26 out of 33 LAB (78.8%) were bactericidal against *V. campbellii* LMG21363. More specifically, 21 out the 33 LAB (63.3%) totally inhibited the growth of *V. campbellii* LMG21363 (5–6 log decrease), while five out of 33 LAB (15.2%) reduced significantly the counts of this pathogen (2–4 log decrease) ($p < 0.01$). On the contrary, two LAB (*W. cibaria* B4620 and P38) (6.1%) increased significantly the growth of *V. campbellii* LMG21363 (1–2 log increase) ($p < 0.05$) after 24 h of co-culture and the rest of *W. cibaria* strains did not modify the growth of this pathogen. The pH values of the supernatants from the co-cultures after 12 and 24 h of incubation were 4.52–5.81 and 4.19–5.16, respectively. In the co-cultures with the LAB that inhibited totally (5–6 log decrease) or decreased significantly (2–4 log decrease) the growth of *V. campbellii* LMG21363 after 12 and 24 h, the pH values were 4.52–5.34 and 4.19–5.01, respectively. Thus, no relationship could be established between the pH decrease and the bactericidal effect of the LAB on *V. campbellii* LMG21363.

VI.4.3. LAB survival in seawater

All LAB strains survived in seawater at 28 °C for 48 h with counts ranging from 2.9×10^3 to 2.5×10^4 cfu/ml (Table VI.2).

Table VI.2. Antimicrobial activity, co-culture with *V. campbellii* LMG21363 and survival in seawater of LAB strains.

Strain	Antimicrobial activity of LAB against <i>V. campbellii</i> LMG21363 ^a		<i>V. campbellii</i> LMG21363 counts in co-culture with LAB ^b				LAB survival in seawater ^c
	Glucose (%)		12 h		24 h		48 h
	0.25	0.60	log cfu/ml	pH	log cfu/ml	pH	log cfu/ml
<i>V. campbellii</i> LMG21363 (control)	Nr	Nr	7.81±0.39	5.47±0.15	5.65±0.77	5.16±0.08	Nr
<i>E. faecium</i> SMA7	+	+	6.96±0.16*	5.15±0.05	Nd	4.43±0.04	4.38±0.08
<i>E. faecium</i> SMA8	+	++	7.38±0.03	5.34±0.06	Nd	4.25±0.03	4.34±0.11
<i>E. faecium</i> SMF8	+	++	7.86±0.19	5.14±0.01	Nd	4.3±0.08	4.32±0.08
<i>E. faecium</i> LPP29	++	++	7.66±0.08	5.28±0.06	Nd	4.22±0.01	4.38±0.07
<i>E. faecium</i> CV1	++	++	7.70±0.26	5.03±0.01	Nd	4.28±0.03	4.36±0.09
<i>E. faecium</i> CV2	++	++	6.73±0.04**	4.84±0.06	Nd	4.26±0.08	4.39±0.09
<i>E. faecium</i> TPM76	++	+++	6.78±0.42**	4.88±0.04	Nd	4.25±0.03	4.34±0.08
<i>E. faecium</i> TPP2	++	++	7.39±0.02	4.98±0.05	Nd	4.28±0.07	4.35±0.09
<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> BCS35	-	+	7.69±0.97	5.63±0.08	3.80±0.11**	4.51±0.01	4.03±0.13
<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>carneus</i> SMA17	+	+	7.88±0.01	5.62±0.06	Nd	4.92±0.03	3.46±0.56
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMF110	+	+	8.10±0.25	5.46±0.06	Nd	4.73±0.01	4.30±0.11
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMF161	++	++	5.24±0.08**	4.52±0.06	Nd	4.19±0.11	4.33±0.10
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMF166	+	+	6.44±0.04**	5.34±0.06	Nd	4.29±0.07	4.31±0.10
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> SMM69	+	++	7.64±0.65	5.32±0.03	Nd	5.01±0.03	4.34±0.07
<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> BCS251	+	++	7.92±0.10	5.33±0.06	Nd	4.66±0.04	4.33±0.09
<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> BCS252	+	+	7.99±0.12	5.54±0.01	Nd	4.73±0.04	4.14±0.20
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SMF120	+	+	7.37±0.10	5.28±0.06	2.74±0.62**	4.85±0.06	4.26±0.22
<i>P. pentosaceus</i> SMF130	+	++	8.15±0.15	5.55±0.01	3.43±0.21**	4.87±0.03	4.27±0.10
<i>P. pentosaceus</i> SMM73	+	+	7.86±0.06	5.61±0.06	Nd	4.86±0.08	4.31±0.09
<i>P. pentosaceus</i> BCS46	-	+	7.64±0.45	5.34±0.06	6.38±0.11	4.88±0.01	4.36±0.10
<i>P. pentosaceus</i> B11	+	+	7.99±0.29	5.57±0.03	Nd	4.89±0.06	4.35±0.09
<i>P. pentosaceus</i> B41	-	+	8.01±0.37	5.73±0.03	Nd	4.81±0.03	4.36±0.09
<i>P. pentosaceus</i> B260	+	+	7.94±0.14	5.70±0.06	Nd	4.82±0.07	4.38±0.07
<i>P. pentosaceus</i> P63	-	+	7.79±0.08	5.29±0.01	3.57±0.29**	4.87±0.03	4.36±0.08
<i>P. pentosaceus</i> P621	-	+	8.05±0.07	5.36±0.08	1.54±0.08**	4.79±0.04	4.34±0.08
<i>P. pentosaceus</i> LPV46	+	+	7.89±0.26	5.81±0.05	Nd	4.79±0.01	4.39±0.09
<i>P. pentosaceus</i> TPP3	+	+	7.75±0.63	5.61±0.07	Nd	4.78±0.01	4.30±0.03
<i>Weissella cibaria</i> BNM69	+	++	7.87±0.02	5.63±0.01	6.70±0.10	5.11±0.03	4.31±0.08
<i>W. cibaria</i> B4620	+	+	8.03±0.06	5.51±0.06	6.93±0.09*	5.12±0.08	4.11±0.03
<i>W. cibaria</i> P38	-	+	8.07±0.04	5.52±0.10	7.07±0.17*	5.13±0.08	3.94±0.72
<i>W. cibaria</i> P69	-	+	7.75±0.08	5.26±0.04	6.24±0.33	4.95±0.06	4.12±0.29
<i>W. cibaria</i> P71	-	-	7.58±0.07	5.29±0.08	6.35±0.13	4.95±0.01	4.32±0.11
<i>W. cibaria</i> P622	-	-	8.04±0.09	5.32±0.08	5.94±0.58	5.01±0.04	3.86±0.59

^aDirect antimicrobial activity was determined by a SPAT using TSA supplemented with glucose. The scores reflect different degrees of growth inhibition (diameter in mm): -, no inhibition; +, 7–9 mm; ++, 10–12 mm; +++, ≥13 mm. None of the LAB strains showed antimicrobial activity when grown in TSA without glucose.

^bResults of viable *V. campbellii* LMG21363 in co-culture with LAB strains are expressed as log cfu/ml (mean ± S.D.) (n=3). Nr, not determined. Nd, not detected. Asterisks denote statistically significant differences with respect to control (**p* < 0.05; ***p* < 0.01).

^cResults of LAB survival are expressed as log cfu/ml (mean ± S.D.) (n=3). Nr, not determined.

VI.4.4. *A. franciscana* gnotobiotic challenge tests

Experiment 1

In a first challenge test, the effect of LAB strains on the survival of *A. franciscana* nauplii infected with the pathogenic strain *V. campbellii* LMG21363 and cultured in FASW was investigated (Table VI.3). Results showed that the addition of heat-inactivated and viable *E. faecium* CV1 and heat-inactivated *L. cremoris* SMF161 significantly enhanced the survival of the infected nauplii (54, 48 and 54%, respectively) with respect to infected nauplii in the absence of LAB (24%) ($p < 0.05$). On the other hand, heat-inactivated and viable *E. faecium* TPM76, *L. cremoris* SMF110, *Lc. cremoris* BCS251, and *P. pentosaceus* SMM73, B11 and B260 had no effect on the survival of infected nauplii (16.0–32%) ($p > 0.05$).

Table VI.3. Survival percentage of *A. franciscana* nauplii fed with LAB and challenged with *V. campbellii* LMG21363 in FASW^a.

Treatments	Survival in FASW (%)
Control	78.7±5.6 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	24.0±4.9 ^C
Heat-inactivated <i>E. faecium</i> CV1 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	54.0±10.6 ^B
Viable <i>E. faecium</i> CV1 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	48.0±7.7 ^B
Control	83.3±4.7 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	28.7±9.6 ^B
Heat-inactivated <i>E. faecium</i> TPM76 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	24.7±6.9 ^B
Viable <i>E. faecium</i> TPM76 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	25.4±6.4 ^B
Control	70.7±12.3 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	14.0±7.6 ^B
Heat-inactivated <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMF110 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	23.3±16.7 ^B
Viable <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMF110 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	24.0±12.3 ^B
Control	78.7±5.6 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	24.0±4.9 ^C
Heat-inactivated <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMF161 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	54.0±17.1 ^B
Viable <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMF161 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	31.4±7.7 ^C
Control	77.3±4.3 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	26.0±6.4 ^{BC}
Heat-inactivated <i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> BCS251 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	32.0±7.7 ^B
Viable <i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> BCS251 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	16.7±10.0 ^C
Control	77.3±4.3 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	26.0±6.4 ^B
Heat-inactivated <i>P. pentosaceus</i> SMM73 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	26.0±5.9 ^B
Viable <i>P. pentosaceus</i> SMM73 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	16.0±3.7 ^B
Control	83.3±4.7 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	28.7±9.6 ^B
Heat-inactivated <i>P. pentosaceus</i> B11 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	29.4±6.4 ^B
Viable <i>P. pentosaceus</i> B11 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	25.4±6.1 ^B
Control	70.7±12.3 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	14.0±7.6 ^B
Heat-inactivated <i>P. pentosaceus</i> B260 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	19.3±2.8 ^B
Viable <i>P. pentosaceus</i> B260 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	20.7±9.2 ^B

^aResults are expressed as mean ± S.D. (n=5). Different capital superscripts denote a significant difference between treatments ($p < 0.05$).

Experiment 2

In a second challenge test, the effect of two individual LAB strains on the survival of *A. franciscana* nauplii infected with *V. campbellii* LMG21363 and cultured in FASW supplemented with 0.01–0.1% glucose was studied (Table VI.4). The mortality percentages of *A. franciscana* were 100% in all groups of infected nauplii cultured in FASW with 1 g/l glucose and in the presence of heat-inactivated or viable LAB strains, showing no significant differences with infected nauplii in the absence of LAB (100% mortality) ($p > 0.05$). Similarly, in the case of the infected nauplii cultured in FASW with 0.1 g/l glucose, the mortality percentages were higher than 95%, and no significant differences were found with infected nauplii in the absence of LAB (94.7%) ($p > 0.05$). No significant differences in survival percentages were found between control groups of uninfected nauplii cultured in FASW with and without glucose (72–84% and 77.3–89.3%, respectively) ($p > 0.05$).

Table VI.4. Survival percentage of *A. franciscana* nauplii fed with LAB and challenged with *V. campbellii* LMG21363 in FASW supplemented with glucose^a.

Treatments	Survival (%) in FASW	
	Glucose (0.1 %) ^b	Glucose (0.01%) ^c
Control	84.0±9.2 ^A	72.0±1.8 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	0 ^B	5.3±3.0 ^B
Heat-inactivated <i>E. faecium</i> CV1 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	0 ^B	0.7±1.5 ^B
Viable <i>E. faecium</i> CV1 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	0 ^B	4.7±5.6 ^B
Control	84.0±9.2 ^A	72.0±1.8 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	0 ^B	5.3±3.0 ^B
Heat-inactivated <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMF161 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	0 ^B	4.7±3.8 ^B
Viable <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMF161 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	0 ^B	4.7±6.5 ^B

^aResults are expressed as mean ± S.D. (n=5). Different capital superscripts denote a significant difference between treatments ($p < 0.05$).

^bSurvival (%) of uninfected and challenged with *V. campbellii* LMG21363 nauplii in FASW without glucose were 89.3±4.3 and 28.0±11.5, respectively.

^cSurvival (%) of uninfected and challenged with *V. campbellii* LMG21363 nauplii in FASW without glucose were 77.3±5.9 and 18.0±10.9, respectively.

Experiment 3

In a third challenge test, the effect of two individual LAB strains on the survival of *A. franciscana* nauplii cultured in FASW with MRS and infected with *V. campbellii* LMG21363 was studied (Table VI.5). The survival percentage of uninfected nauplii treated with heat-inactivated and viable *E. faecium* CV1 (78 and 76%, respectively) or heat-inactivated and viable *L. cremoris* SMF161 (78.7% in both cases) was similar to that of uninfected nauplii in the absence of LAB (71.3–74.7%) ($p > 0.05$). In the case of infected nauplii, no significant differences in the survival percentages were found in the presence and absence of LAB (4–56% and 42–53.2%, respectively) ($p > 0.05$), except in those treated with heat-inactivated *L. cremoris* SMF161, in which the survival percentage increased significantly (66%) ($p < 0.05$). Moreover, no significant differences in survival percentages were found between control groups of uninfected nauplii cultured in FASW with and without MRS (71.3–74.7% and 80.7–85.3%, respectively) ($p > 0.05$).

Table VI.5. Survival percentage of *A. franciscana* nauplii fed with LAB and challenged with *V. campbellii* LMG21363 in FASW supplemented with MRS broth^a.

Treatments	Survival (%) in FASW + MRS	
	Heat-inactivated LAB ^b	Viable LAB ^c
Control	74.7±6.0 ^A	71.3±13.7 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	53.3±8.1 ^B	42.0±17.4 ^B
<i>E. faecium</i> CV1	78.0±9.6 ^A	74.0± 8.6 ^A
<i>E. faecium</i> CV1 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	56.0±12.6 ^B	46.0± 7.6 ^B
Control	74.7±6.0 ^{AB}	71.3±13.7 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	53.3±8.1 ^C	42.0±17.4 ^B
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMF161	76.0±7.6 ^{AB}	78.7± 7.7 ^A
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SMF161 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	66.0±10.9 ^B	48.0± 14.6 ^B

^aResults are expressed as mean ± S.D. (n=5). Different capital superscripts denote a significant difference between treatments ($p < 0.05$).

^bSurvival (%) of unchallenged and challenged with *V. campbellii* LMG21363 nauplii in FASW without MRS were 85.3±9.3 and 38.0±9.6, respectively.

^cSurvival (%) of unchallenged and challenged with *V. campbellii* LMG21363 nauplii in FASW without MRS were 80.7±1.5 and 44.7±15.2, respectively.

Experiment 4

In a fourth challenge test, the effect of a pool of LAB strains on the survival of *A. franciscana* nauplii cultured in FASW and infected with *V. campbellii* LMG21363 was investigated (Table VI.6). The addition of heat-inactivated or viable LAB did not increase significantly the survival percentage of infected nauplii (22.7–38%, respectively) with respect to infected nauplii without LAB (23.3%) ($p > 0.05$), except in the case of both the heat-inactivated and viable LAB 2 group (40.7–42%) ($p < 0.05$).

Table VI.6. Survival percentage of *A. franciscana* nauplii fed with pooled LAB strains and challenged with *V. campbellii* LMG21363 in FASW^a.

Treatments	Survival (%) in FASW
Control	65.3±12.6 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	23.3±14.9 ^B
Heat-inactivated LAB 1 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	38.0±14.8 ^B
Viable LAB 1 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	33.3±4.7 ^B
Control	65.3±12.6 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	23.3±14.9 ^C
Heat-inactivated LAB 2 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	42.0±11.7 ^B
Viable LAB 2 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	40.7±4.3 ^B
Control	65.3±12.6 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	23.3±14.9 ^B
Heat-inactivated LAB 3 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	30.7±11.8 ^B
Viable LAB 3 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	34.7±10.7 ^B
Control	65.3±12.6 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	23.3±14.9 ^B
Heat-inactivated LAB 4 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	38.0±11.2 ^B
Viable LAB 4 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	34.7±13.7 ^B
Control	65.3±12.6 ^A
<i>V. campbellii</i> LMG21363	23.3±14.9 ^B
Heat-inactivated LAB 5 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	36.0±10.4 ^B
Viable LAB 5 + <i>V. campbellii</i> LMG21363	22.7±6.4 ^B

^aResults are expressed as mean ± S.D. (n=5). Different capital superscripts denote a significant difference between treatments ($p < 0.05$). LAB strains used in each bacterial pool: LAB 1 (*E. faecium* CV2, *E. faecium* SMA8, *L. cremoris* SMF166, *P. pentosaceus* TPP3, and *P. pentosaceus* B11); LAB 2 (*E. faecium* CV1, *L. cremoris* SMF161, *L. cremoris* SMF110, and *P. pentosaceus* B260); LAB 3 (*E. faecium* TPM76, *E. faecium* LPP29, *Lb. carnosus* SMA17, *Lc. cremoris* BCS252, and *P. pentosaceus* LPV46); LAB 4 (*E. faecium* TPP2, *E. faecium* SMA7, *Lc. cremoris* BCS251, and *P. pentosaceus* SMM73); and LAB 5 (*E. faecium* SMF8, *E. faecium* L50, *L. lactis* BB24, *P. acidilactici* 347, and *P. pentosaceus* B41).

VI.5. DISCUSSION

None of the 33 LAB evaluated in this work showed antimicrobial activity against *V. campbellii* LMG21363 in TSA without glucose; however, most of the strains exerted direct antimicrobial activity against this pathogen in TSA-G, being the maximum antimicrobial activity obtained at 0.60% (wt/v) glucose (Table VI.2). From the tested strains, 24 (72.7%) and 31 (93.9%) displayed antimicrobial activity against *V. campbellii* LMG21363 in TSA-G (0.25 and 0.60% [wt/v] glucose, respectively). On the other hand, supernatants from 31 out of the 33 strains (93.9%) inhibited the growth of *V. campbellii* LMG21363 (results not shown). The antimicrobial activity of the supernatants withstood proteinase K and heat, but disappeared after adjusting their pH to 6.2. These results suggest that the inhibition exerted by the LAB on this pathogen might be due to the production of organic acids. With regard to this, the production of antimicrobial compounds such as organic acids, hydrogen peroxide and ribosomally-synthesized peptides (*i.e.*, bacteriocins) active against pathogenic microorganisms is a desirable property of LAB intended for use as fish probiotics (Ringø and Gatesoupe, 1998; Gatesoupe, 2008). Several LAB have been found to exert antimicrobial activity against fish pathogens (Balcázar *et al.*, 2008; Ringø *et al.*, 2010a; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011a; Muñoz-Atienza *et al.*, 2013a); however, to our knowledge, the inhibition of *V. campbellii* by these bacteria has not been previously reported. Moreover, in this work all the assayed strains but those belonging to the *W. cibaria* species (26 out of 33 strains, 78.8%) were shown to exert an inhibitory effect against *V. campbellii* LMG21363 when co-cultured with this pathogen. Interestingly, since no association could be established between the inhibition of *V. campbellii* LMG21363 and the pH values observed in the co-cultures, it is likely that growth inhibition might be due to the competence for the nutrients and/or the production of organic acids and other antimicrobial compounds. In this context, the inhibitory effect of these acids is related to their ability to cross the membranes of microorganisms in their undissociated form and then dissociate internally, causing the acidification of the cytoplasm and, in turn, the expulsion of H⁺ ions from the cells and the subsequent uncoupling of the Na⁺/K⁺-ATPase pump (Gonçalves *et al.*, 1997). At this respect, it has been reported that organic acids produced by LAB are responsible for their inhibitory effect against turbot pathogenic vibrios (*V. alginolyticus*, *V. pelagius* and *V. splendidus*) (Vázquez *et al.*, 2005), and other pathogens such as *Escherichia coli*, *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* (Tejero-Sariñena *et al.*, 2012). On the other hand, LAB survival in seawater is a desirable property for strains intended for use as probiotics in marine fish aquaculture (Vázquez *et al.*, 2003). In this respect, our study revealed the survival of all the LAB of aquatic origin in seawater at 28 °C for 48 h.

The *in vivo* antagonistic activity of potential probiotics has been studied by determining their protective effect in crustacean models like *A. franciscana* challenged with pathogenic bacteria (Verschuere *et al.*, 2000a; Marques *et al.*, 2006b). In our study, we assessed the effect of LAB (1×10^7

cfu/ml) on the protection of *A. franciscana* against the pathogen *V. campbellii* LMG21363 (1×10^7 cfu/ml) using four different gnotobiotic challenge test designs. The survival of *A. franciscana* nauplii exposed to heat-inactivated and viable LAB was compared in order to be able to separate the effects which could be exclusively attributed to live cells (e.g., prevention of the proliferation of opportunistic pathogens by competing for nutrients, space and/or adhesion sites in the gut or on the surface of artemia or by producing inhibitory compounds; supply of active bacterial enzymes allowing additional digestive abilities, and/or improvement of water quality) (Marques *et al.*, 2005) to those shared by both live and dead bacteria (e.g., nutritional and/or immune response stimulatory effects). The results obtained in FASW showed that only heat-inactivated and viable *E. faecium* CV1 and heat-inactivated *L. cremoris* SMF161 protected *A. franciscana* against *V. campbellii* (Table VI.3). These results suggest that bacteria could improve artemia nutritional status, helping in this way to prevent the detrimental effects of this pathogen (Marques *et al.*, 2006b), and/or that some molecule(s), such as the conserved microbe-associated molecular patterns (MAMPs) could stimulate the innate immune response and thus enhance artemia survival. In this context, Baruah *et al.* (2010) reported that the survival of *A. franciscana* challenged with *V. campbellii* improved when fed with *E. coli* overproducing homologous and heterologous (from *A. franciscana*) heat shock protein 70 (Hsp70) had an effect due to the induction of an immunological response, namely an increase of phenoloxidase activity, which is one of the most important defense mechanisms in crustaceans.

On the other hand, it is known that culturing of *A. franciscana* under starvation conditions or with poor quality feeds results in an increased vulnerability to diseases caused by opportunistic and pathogenic bacteria (Marques *et al.*, 2006b). Accordingly, it has been reported that the survival of *A. franciscana* challenged with *V. campbellii* LMG21363 (5×10^6 cfu/ml) in the presence of *Bacillus* sp. LVS2 and *Aeromonas hydrophila* LVS3 (5×10^6 cfu/ml) increased only when supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* of medium-quality (a mutant yeast containing higher concentrations of chitin and glucans in the cell wall cultured in yeast extract peptone dextrose medium) or good-quality (the same mutant yeast cultured in yeast nitrogen based medium), but not with poor-quality wild type yeast or in the absence of yeast (Marques *et al.*, 2006b). In fact, the daily addition of medium- or good-quality yeast to *A. franciscana* (without addition of bacteria) completely prevented the detrimental effects of the virulent pathogen *V. campbellii* LMG21363. Similarly, it has been reported that *Saccharomyces boulardii* (1×10^4 cfu/ml) exerts a protective effect on *A. franciscana* nauplii against *V. harveyi* (6.1×10^6 cfu/ml) (Patra and Mohamed, 2003), and six different LAB strains independently (*Lb. casei* BR51, *Lb. casei* X2, *Lb. dextrinicus* BR743, *Lb. plantarum* 611, *Lb. plantarum* B3G, or *Lc. mesenteroides* B31 [10^6 – 10^7 cfu/ml]) with a sterilized commercial enrichment product improved the survival of *A. franciscana* challenged with the pathogen *V. alginolyticus* ATCC17749 (10^6 – 10^7 cfu/ml); however, the effect of the enrichment feed alone on the survival of *A. franciscana* in the presence of the pathogen was not reported (Lamari *et al.*, 2014). On the other hand, Verschuere *et al.*

(2000a) described that several strains (5×10^6 cfu/ml) classified within the family Vibrionaceae and the genera *Moraxella* and *Kurthia* exerted a total protection against the pathogenic action of *V. proteolyticus* CW8T2 (10^2 or 10^3 cfu/ml) in *A. franciscana* fed with γ -irradiated dry food. Therefore, it is possible that in the gnotobiotic challenge tests carried out in this work we could not detect a protective effect against the tested pathogenic vibrio of more LAB due to the lack of additional food supplementation to *A. franciscana*.

In order to supply some substrate that would allow the production of inhibitory compounds against *V. campbellii* LMG21363 by the LAB strains, a second challenge test was designed to study their effect on the protection of *A. franciscana* in FASW supplemented with glucose. However, we observed that *A. franciscana* mortality was increased in a glucose concentration-dependent manner in all infected animals, probably due to the oxygen starvation caused by the oxidative metabolism of glucose by *V. campbellii* LMG21363 (Table VI.4). In a third gnotobiotic challenge test design carried out in FASW supplemented with MRS broth, we first observed that LAB did not exert any detrimental effects when added to uninfected *A. franciscana* (Table VI.5). Several reports have described a similar effect on *A. franciscana* survival in the presence of bacteria, yeasts or microalgae (Verschuere *et al.*, 1999; Orozco-Medina *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2005). In this challenge test, only heat-inactivated *L. cremoris* SMF161 showed a positive effect in *A. franciscana* survival (Table VI.5) when nauplii were previously cultured with LAB in FASW supplemented with MRS, supporting the hypothesis that dead bacterial biomass served as a nutritional complement for *A. franciscana* and/or that some molecule(s) could stimulate the innate immune response and thus enhance the artemia survival.

Finally, we evaluated the effect of a LAB pool on the protection of *A. franciscana* in FASW. We found that the LAB 2 group (*E. faecium* CV1, *L. cremoris* SMF161, *L. cremoris* SMF110, and *P. pentosaceus* B260) improved *A. franciscana* survival using both heat-inactivated and live forms, suggesting that bacteria could improve artemia nutritional status and/or some molecule(s) could stimulate the innate immune response and thus improve its survival against this pathogen. In a previous study, the beneficial effect of two bacteria (*Microbacterium* sp. 8L and/or *Exiguobacterium* sp. 8N) independently or mixed on artemia survival has been only demonstrated when artemia was fed with an additional yeast solution (Orozco-Medina *et al.*, 2002). In summary, it seems that it is more difficult to demonstrate a beneficial effect in *A. franciscana* survival with bacterial strains used independently or even combined than when supplemented with yeast.

This is to our knowledge the first study describing the antimicrobial activity of LAB against *V. campbellii* in both solid media and co-cultures. Moreover, evaluation of the effect of glucose and MRS broth on the activity of LAB added to uninfected and infected *A. franciscana* cultures has not been previously reported. The data obtained in this work suggest that *E. faecium* CV1 and *L. cremoris* SMF161 could cover *A. franciscana* nutritional needs and/or enhance its immune response, helping in

this way to surmount the effects of pathogenic *V. campbellii* LMG21363. Nevertheless, further studies need to be carried out using improved *A. franciscana* nutrition conditions (e.g., by supplementation with yeast) in an attempt to enhance LAB probiotic effects related to the protection of *A. franciscana* against this pathogen.

VI.6. REFERENCES

- Aguirre-Guzmán, G., H. Mejia Ruíz, and F. Ascencio.** 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquac. Res.*, 35: 1395–1404.
- Balcázar, J. L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, J. L. Muzquiz, and O. Girones.** 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278: 188–191.
- Baruah, K., J. Ranjan, P. Sorgeloos, and P. Bossier.** 2010. Efficacy of heterologous and homologous heat shock protein 70s as protective agents to *Artemia franciscana* challenged with *Vibrio campbellii*. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 733–739.
- Cabello, F. C.** 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, 8: 1137–1144.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández, and H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes, and L. S. Havarstein.** 1998a. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, 180: 1988–1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández, and P. E. Hernández.** 1998b. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.*, 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Havarstein, H. Holo, P. E. Hernandez, and I. F. Nes.** 2000d. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, 182: 6806–6814.
- Chatterjee, S., and S. Haldar.** 2012. *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *J. Marine Sci. Res. Dev.*: S1:002.
- Defoirdt, T., R. Crab, T. K. Wood, P. Sorgeloos, W. Verstraete, and P. Bossier.** 2006. Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 6419–6423.
- Defoirdt, T., N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete, and P. Bossier.** 2007b. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol.*, 25: 472–479.

- Defoirdt, T., W. Verstraete, and P. Bossier.** 2008. Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. *J. Appl. Microbiol.*, 104: 1480–1487.
- Defoirdt, T., P. Sorgeloos, and P. Bossier.** 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.*, 14: 251–258.
- FAO.** 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*, 469: 1–97.
- Gatesoupe, F. J.** 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 107–114.
- Gómez-Gil, B., S. Soto-Rodríguez, A. García-Gasca, A. Roque, R. Vázquez-Juárez, F. L. Thompson, and J. Swings.** 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, 150: 1769–1777.
- Gómez-Sala, B., A. Basanta, J. Sánchez, M. Martín, R. Criado, J. Gutiérrez, R. Citti, C. Herranz, P. E. Hernández, and L. M. Cintas.** 2004. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and fish products. *13^{ème} Colloque du Club des Bactéries Lactiques*, p. 45. Abstracts, ENITIAA and French National Institute for Agricultural Research (INRA), Nantes, France.
- Gonçalves, L. M. D., A. Ramos, J. S. Almeida, A. M. R. B. Xavier, and M. J. T. Carrondo.** 1997. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 48: 346–350.
- Hai, N. V., R. Fotedar, and N. Buller.** 2007. Selection of probiotics by various inhibition test methods for use in the culture of western king prawns, *Penaeus latisulcatus* (Kishinouye). *Aquaculture*, 272: 231–239.
- Hameed, A. S. S., P. V. Rao, J. J. Farmer, F. W. Hickman-Brenner, and G. R. Fanning.** 1996. Characteristics and pathogenicity of a *Vibrio campbellii*-like bacterium affecting hatchery-reared *Penaeus indicus* (Milne Edwards, 1837) larvae. *Aquac. Res.*, 27: 853–863.
- Jun, L. J., J. H. Kim, J. W. Jin, and H. D. Jeong.** 2012. Characterization of a new beta-lactamase gene from isolates of *Vibrio* spp. in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 22: 555–62.
- Karunasagar, I., R. Pai, G. R. Malathi, and I. Karunasagar.** 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203–209.
- Lamari, F., K. Sadok, A. Bakhrouf, and F.-J. Gatesoupe.** 2014. Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and *in vivo* test on *Artemia* nauplii. *Aquacult. Int.*, 22: 699–709.
- Lavens, P., and P. Sorgeloos.** 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*, 181: 397–403.
- Marques, A., T. Dinh, C. Ioakeimidis, G. Huys, J. Swings, W. Verstraete, J. Dhont, P. Sorgeloos, and P. Bossier.** 2005. Effects of bacteria on *Artemia franciscana* cultured in different gnotobiotic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 4307–4317.
- Marques, A., F. Ollevier, W. Verstraete, P. Sorgeloos, and P. Bossier.** 2006a. Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host-microbe interactions. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 903–918.
- Marques, A., T. Huynh Thanh, W. Verstraete, J. Dhont, P. Sorgeloos, and P. Bossier.** 2006b. Use of selected bacteria and yeast to protect gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 334: 20–30.

- Marques, A., T. H. Thanh, P. Sorgeloos, and P. Bossier.** 2006c. Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Aquaculture*, 258: 116–126.
- Muñoz-Atienza, E., B. Gómez-Sala, C. Araújo, C. Campanero, R. del Campo, P. E. Hernández, C. Herranz, and L. M. Cintas.** 2013a. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol.*, 13: 15.
- Nayak, S. K.** 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 2–14.
- Olafsen, J. A.** 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, 200: 223–247.
- Orozco-Medina, C., A. M. Maeda-Martínez, and A. López-Cortés.** 2002. Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquaculture*, 213: 15–29.
- Papandroulakis, N., P. Divanach, P. Anastasiadis, and M. Kentouri.** 2001. The pseudo-green water technique for intensive rearing of sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquacult. Int.*, 9: 205–216.
- Patra, S. K., and K. S. Mohamed.** 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquacult. Int.*, 11: 505–514.
- Pérez-Sánchez, T., J. L. Balcázar, Y. García, N. Halaihel, D. Vendrell, I. de Blas, D. L. Merrifield, and I. Ruiz-Zarzuela.** 2011a. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.*, 34: 499–507.
- Phuoc, L. H., M. Corteel, H. J. Nauwynck, M. B. Pensaert, V. Alday-Sanz, W. Van den Broeck, P. Sorgeloos, and P. Bossier.** 2008. Increased susceptibility of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio campbellii*. *Environ. Microbiol.*, 10: 2718–2727.
- Ringø, E., and F.-J. Gatesoupe.** 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177–203.
- Ringø, E., L. Løvmo, M. Kristiansen, Y. Bakken, I. Salinas, R. Myklebust, R. E. Olsen, and T. M. Mayhew.** 2010a. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquac. Res.*, 41: 451–467.
- Sakai, M.** 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63–92.
- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy, and D. Ansquer.** 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191: 133–144.
- Sommerset, I., B. Krossoy, E. Biering, and P. Frost.** 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert. Rev. Vaccines*, 4: 89–101.
- Sorgeloos, P., M. Dehasque, P. Dhert, and P. Lavens.** 1995. Review of some aspects of marine fish larviculture. *ICES Mar. Sci. Symp.*, 201: 138–142.
- Soto-Rodríguez, S. A., A. Roque, M. L. Lizarraga-Partida, A. L. Guerra-Flores, and B. Gómez-Gil.** 2003. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Dis. Aquat. Organ.*, 53: 231–240.
- Soto-Rodríguez, S. A., N. Simoes, A. Roque, and B. Gómez Gil.** 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture*, 258: 109–115.

- Tejero-Sariñena, S., J. Barlow, A. Costabile, G. R. Gibson, and I. Rowland.** 2012. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18: 530–538.
- Teo, J. W., A. Suwanto, and C. L. Poh.** 2000. Novel beta-lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrob. Agents Ch.*, 44: 1309–1314.
- Thibodeaux, L. K., K. G. Burnett, and L. E. Burnett.** 2009. Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. *J. Exp. Biol.*, 212: 3428–3439.
- Vaseeharan, B., and P. Ramasamy.** 2003. Abundance of potentially pathogenic micro-organisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. *Microbiol. Res.*, 158: 299–308.
- Vázquez, J. A., M. L. Cabo, M. P. González, and M. A. Murado.** 2003. Survival of lactic acid bacteria in seawater: a factorial study. *Curr. Microbiol.*, 47: 508–513.
- Vázquez, J. A., M. P. González, and M. A. Murado.** 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245: 149–161.
- Verschuere, L., J. Dhont, P. Sorgeloos, and W. Verstraete.** 1997. Monitoring Biolog patterns and r/K-strategists in the intensive culture of *Artemia* juveniles. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 603–612.
- Verschuere, L., G. Rombaut, G. Huys, J. Dhont, P. Sorgeloos, and W. Verstraete.** 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2527–2533.
- Verschuere, L., H. Heang, G. Criel, P. Sorgeloos, and W. Verstraete.** 2000a. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1139–1146.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, and W. Verstraete.** 2000b. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 655–671.
- Villamil, L., A. Figueras, M. Planas, and B. Novoa.** 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*, 219: 43–56.
- Vine, N. G., W. D. Leukes, and H. Kaiser.** 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30: 404–427.
- Wang, L., Y. Chen, H. Huang, Z. Huang, H. Chen, and Z. Shao.** 2013. Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Res.*: 1–10.
- Wang, Y.-B., J.-R. Li, and J. Lin.** 2008b. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, 281: 1–4.
- Yousefian, M., and M. S. Amiri.** 2009. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *Afr. J. Biotechnol.*, 8: 7313–7318.

CAPÍTULO VII

**Efecto de bacterias lácticas de origen acuático inactivadas
y viables sobre leucocitos de riñón anterior de rodaballo
(*Scophthalmus maximus* L.)**

CHAPTER VII

***Different impact of heat-inactivated and viable lactic acid bacteria
of aquatic origin on turbot (*Scophthalmus maximus* L.)
head-kidney leucocytes***

Fish & Shellfish Immunology (2015), 44: 214–223



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi

Full length article

Different impact of heat-inactivated and viable lactic acid bacteria of aquatic origin on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) head-kidney leucocytes

Estefanía Muñoz-Atienza^a, Carlos Araújo^{a,b}, Nuria Lluch^c, Pablo E. Hernández^a,
Carmen Herranz^a, Luis M. Cintas^a, Susana Magadán^{c,*}

^a Grupo de Seguridad y Calidad de los Alimentos por Bacterias Lácticas, Bacteriocinas y Probióticos (Grupo SEGABALBP), Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain

^b Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Genomics and Biotechnology, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5001-801-Vila Real, Portugal

^c Centro Oceanográfico de Vigo, Instituto Español de Oceanografía (IEO), 36390-Vigo, Pontevedra, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2014

Received in revised form

5 February 2015

Accepted 12 February 2015

Available online 21 February 2015

Keywords:

Fish probiotics

Lactic acid bacteria

Apoptosis

In vitro immunomodulation

Turbot head-kidney leucocytes

ABSTRACT

In aquaculture, several criteria should be considered to select an appropriate probiotic, including the aquatic origin and safety of the strain and its ability to modulate the host immune response. The properties and effects of probiotics are strain-specific and some factors such as viability, dose and duration of diet supplementation may regulate their immunomodulatory activities. In this study, we assessed the *in vitro* effect of eight heat-inactivated and viable lactic acid bacteria (LAB) of aquatic origin belonging to the genera *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Weissella* on the viability and innate immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) leucocytes. Head-kidney leucocytes were incubated with viable and heat-inactivated LAB at different concentrations. After incubation, the viability of leucocytes was evaluated using colorimetric assays (MTT and LDH) and flow cytometry (annexin V/propidium iodide). Heat-inactivated LAB showed no cytotoxic effect while viable LAB exerted variable influence on apoptosis of turbot phagocytes and lymphocytes. Leucocyte respiratory burst activity and phagocytosis were also differentially activated, as viable LAB stimulated leucocytes more efficiently than the heat-inactivated LAB. Our results suggest diverse strain-specific mechanisms of interaction between the evaluated LAB and turbot leucocytes. Furthermore, our work sets up *in vitro* systems to evaluate the effect of LAB as potential probiotics, which will be useful to develop efficient screening.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aquaculture has become an important economic activity in many countries. Among all farmed species, turbot (*Scophthalmus maximus* L.) represents the main flatfish, being cultured in Europe with a production over 12,000 t in 2012 [1]. The success of the aquaculture industry is supported by a deep knowledge of the

biology and nutritional requirements of fish during their life cycle, as well as by a good understanding of their immune response against different kinds of pathogens. Despite significant progress in hatchery and culture techniques, one of the main problems in turbot farming, and in general, in aquaculture, remains the frequent emergence of pathogens. When an infection outbreak occurs in a fish farm, the application of antibiotics or other chemotherapies can be an effective control strategy. However, the use of these methods is detrimental to the environment and human health due to the development and transfer of antibiotic resistance to other bacteria [2]. Additionally, in many cases, these control strategies are cost-effective. In this sense, interest in development of probiotics for aquaculture has increased during the last years to control fish diseases and reduce the use of antibiotics [3,4].

* Corresponding author. Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA, 78352-Jouy-en-Josas, France. Tel.: +33 01 34652589; fax: +33 01 34652873.

E-mail address: susana.magadan@jouy.inra.fr (S. Magadán).

¹ Current address: Virologie et Immunologie Moléculaires, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 78352-Jouy-en-Josas, France.

CAPÍTULO VIII

**Evaluación *in vitro* e *in vivo* de bacterias lácticas de origen acuático
como probióticos para el cultivo del rodaballo
(*Scophthalmus maximus* L.)**

CHAPTER VIII

***In vitro and in vivo evaluation of lactic acid bacteria of aquatic
origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming***

***Fish & Shellfish Immunology* (2014), 41: 570–580**



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi

Full length article

In vitro and *in vivo* evaluation of lactic acid bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming

Estefanía Muñoz-Atienza^a, Carlos Araújo^{a,b}, Susana Magadán^{c,1}, Pablo E. Hernández^a, Carmen Herranz^a, Ysabel Santos^d, Luis M. Cintas^{a,*}

^a Grupo de Seguridad y Calidad de los Alimentos por Bacterias Lácticas, Bacteriocinas y Probióticos (Grupo SEGABALBP), Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid, Spain

^b Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Genomics and Biotechnology, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5001-801 Vila Real, Portugal

^c Centro Oceanográfico de Vigo, Instituto Español de Oceanografía (IEO), 36390 Vigo, Pontevedra, Spain

^d Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Biology, University of Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2014

Received in revised form

2 October 2014

Accepted 4 October 2014

Available online 16 October 2014

Keywords:

Turbot (*Scophthalmus maximus* L.)

Probiotics

Lactic acid bacteria

Functional properties

Immunity-related gene expression

ABSTRACT

Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) is an important commercial marine flatfish. Its production may be affected by bacterial diseases that cause severe economical losses, mainly tenacibaculosis and vibriosis, provoked by *Tenacibaculum maritimum* and *Vibrio splendidus*, respectively. An alternative or complementary strategy to chemotherapy and vaccination for the control of these diseases is the use of probiotics. In this work, we report the *in vitro* and *in vivo* potential of eight lactic acid bacteria (LAB), previously isolated from fish, seafood and fish products intended for human consumption, as turbot probiotics. Seven out of the eight LAB exerted direct antimicrobial activity against, at least, four strains of *T. maritimum* and *V. splendidus*. All LAB survived in seawater at 18 °C for 7 days, and withstood exposure to pH 3.0 and 10% (v/v) turbot bile; however, they differed in cell surface hydrophobicity (8.2–21.7%) and in their ability to adhere to turbot skin (1.2–21.7%) and intestinal (0.7–2.1%) mucus. Most of the tested strains inhibited the binding of turbot pathogens to the mucus. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* SMM69 and *Weissella cibaria* P71 were selected based on their strong antimicrobial activity against *T. maritimum* and *V. splendidus*, good probiotic properties, and different adhesion ability to skin mucus and capacity to inhibit the adhesion of turbot pathogens to mucus. These two LAB strains were harmless when administered by bath to turbot larvae and juveniles; moreover, real-time PCR on the transcription levels of the immunity-related genes encoding IL-1 β , TNF- α , lysozyme, C3, MHC-I α and MHC-II α in five organs (head-kidney, spleen, liver, intestine and skin) revealed the ability of these LAB to stimulate their expression in turbot juveniles, especially the non-specific immunity associated genes in mucosal tissues. Based on our results, *Lc. cremoris* SMM69 and *W. cibaria* P71 may be considered as suitable probiotic candidates for turbot farming.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) aquaculture is a mature technology with a global production of 77,118 tons in 2012; however, a continued research and development effort is required for the prevention and control of fish diseases [1]. In this respect,

* Corresponding author. Departamento de Nutrición, Bromatología y, Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040-Madrid, Spain. Tel.: +34 913943751; fax: +34 913943743.

E-mail address: lcintas@vet.ucm.es (L.M. Cintas).

¹ Current address: Virologie et Immunologie Moléculaires, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 78352 Jouy-en-Josas, France.

tenacibaculosis and vibriosis are considered the main turbot diseases, causing severe economic losses in turbot farming. Tenacibaculosis (or flexibacteriosis) is a bacterial disease caused by *Tenacibaculum maritimum* (formerly, *Flexibacter maritimus*), a Gram-negative filamentous biofilm-forming microorganism that affects cultured adults and juvenile marine fish, with the latter suffering the most severe form of the disease [2]. Vibriosis is one of the main bacterial diseases that causes most of the economical problems in fish marine culture, and it is provoked by several species of fish-pathogenic vibrios [2,3]. One of the most relevant pathogenic vibrio species is *Vibrio splendidus*, a Gram-negative microorganism linked with high rates of mortality in larval turbot rearing fed with live feed [3]. In the fish farming sector, antibiotics

CAPÍTULO IX

Discusión integradora

En este trabajo de investigación se procedió a la caracterización y evaluación *in vitro* e *in vivo* de una colección de bacterias lácticas aisladas previamente por nuestro grupo investigador de pescado, marisco y productos de la pesca (Gómez-Sala *et al.*, 2004, 2015; Gómez-Sala, 2013) con el objetivo de seleccionar las cepas más adecuadas para su empleo como probióticos para el cultivo intensivo de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). A este respecto, los tratamientos probióticos en acuicultura pueden considerarse como: (1) métodos de biocontrol y biorremediación, ya que permiten la introducción de microorganismos que, mediante diferentes mecanismos, (i) posibilitan que los microorganismos patógenos puedan ser eliminados o reducidos en número en el ambiente acuícola, (ii) reducen la formación de biopelículas (*biofilms*) causada por bacterias y hongos en las instalaciones (*biofouling*) y/o (iii) actúan como biorreactores y permiten el reciclaje de nutrientes (nitrógeno, fósforo y otras sustancias biodegradables) debido a la posibilidad de emplear el agua de desecho de las instalaciones para su crecimiento; así como (2) probióticos *sensu stricto*, debido a su capacidad para (i) controlar las ictiopatologías de origen bacteriano, (ii) contribuir a que el alimento se aproveche de forma óptima estimulando el crecimiento, (iii) mejorar la calidad del agua y (iv) modular el sistema inmune del hospedador. En este trabajo se propone el desarrollo de una estrategia alternativa o complementaria a la quimioterapia y la vacunación, basada en el empleo como probióticos de bacterias lácticas de origen acuático, para la prevención y el control de las ictiopatologías más importantes para el cultivo intensivo de rodaballo, especie de gran relevancia para la acuicultura marina española. Además, esta estrategia permitiría mejorar la productividad animal y la calidad y seguridad de los productos comercializados, así como minimizar el deterioro medioambiental del medio acuático de las piscifactorías mediante la mejora de su calidad físico-química y microbiológica, el reciclaje de nutrientes y agua y la supresión de biopelículas bacterianas. En este contexto, en este trabajo se han utilizado diversas técnicas microbiológicas, bioquímicas, genéticas e inmunológicas para la consecución de los siguientes objetivos:

1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas de origen acuático.
2. Evaluación de la seguridad *in vitro* de bacterias lácticas de origen acuático.
3. Tipificación molecular de cepas de *Enterococcus faecium* de origen alimentario mediante la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE) y diversas técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
4. Evaluación de la eficacia de bacterias lácticas de origen acuático para la protección de *Artemia franciscana* frente a *Vibrio campbellii* empleando ensayos de exposición de cultivos gnotobióticos (axénicos).
5. Evaluación *in vitro* de los efectos de bacterias lácticas de origen acuático inactivadas y viables en leucocitos de riñón anterior de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.).

6. Evaluación *in vitro* de las propiedades funcionales y probióticas de bacterias lácticas de origen acuático para su empleo como probióticos para el cultivo intensivo de rodaballo.
7. Evaluación *in vivo* de la seguridad de *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69 y *Weissella cibaria* P71 y de su efecto en la modulación del sistema inmune del rodaballo.

IX.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO

En este trabajo, se evaluó la actividad antimicrobiana frente a los principales microorganismos patógenos de interés en acuicultura y la seguridad *in vitro* de 99 bacterias lácticas (59 del género *Enterococcus* y 40 de otros géneros), previamente aisladas de pescado, marisco y productos de la pesca (Gómez-Sala *et al.*, 2004, 2015; Muñoz-Atienza, 2009; Gómez-Sala, 2013), utilizando diversas técnicas microbiológicas con el objetivo de identificar y seleccionar las cepas con un espectro de acción más interesante para su posterior caracterización como probióticos para la acuicultura (Capítulo III).

El aislamiento y la caracterización de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana de pescado y productos de la pesca ha sido descrito con anterioridad, aunque generalmente los estudios han estado enfocados a pescados de agua dulce (Ringø y Gatesoupe, 1998; Gatesoupe, 1999; González *et al.*, 1999; Ringø *et al.*, 2000; Hagi *et al.*, 2004; Bucio *et al.*, 2006) o pescado fermentado (Cai *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2005). Conviene destacar que aunque los peces de agua salada también contienen bacterias lácticas, los estudios sobre el aislamiento y la caracterización de cepas con actividad antimicrobiana son muy escasos (Seppola *et al.*, 2006; Desriac *et al.*, 2010; Gómez-Sala, 2013). Por otra parte, se ha documentado ampliamente que cepas candidatas para ser utilizadas como probióticos que se han aislado de agua de cultivo o del mismo hospedador en el que van a ser utilizadas se desarrollan mejor que bacterias de distinto origen (Verschuere *et al.*, 2000b; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Vine *et al.*, 2006; Nayak, 2010; Merrifield *et al.*, 2010b). Sin embargo, varios probióticos comerciales empleados en el hombre y animales terrestres han resultado eficaces en peces (Nikoskelainen *et al.*, 2001a, 2003; Panigrahi *et al.*, 2007; Castex *et al.*, 2008; Ferguson *et al.*, 2010) y bacterias aisladas de peces han mostrado su eficacia en especies distintas a la de origen (Díaz-Rosales *et al.*, 2009; Sorroza *et al.*, 2012). Con el objeto de seleccionar entre las 99 bacterias lácticas las cepas con actividad antimicrobiana directa frente a los ictiopatógenos de relevancia para la acuicultura, se utilizó la técnica de inhibición por siembra en picadura (ISP) (Cintas *et al.*, 1995) frente a ocho microorganismos patógenos Gram-positivos y Gram-negativos causantes de diversas ictiopatologías, entre los que se incluyen *L. garvieae*, *St. agalactiae*, *St. iniae*, *A. hydrophila*, *Ls. anguillarum*, *Ph. damsela* y *V. alginolyticus*. La actividad antimicrobiana directa de las 99 bacterias lácticas seleccionadas se cuantificó determinando el diámetro de los halos de inhibición, considerándose significativos

únicamente aquellos con un diámetro igual o superior a 3 mm (Tabla 1; Capítulo III). Nuestros resultados revelaron que la mayoría de las bacterias lácticas de origen acuático estudiadas en este trabajo mostraron un amplio espectro de acción antimicrobiana frente a ictiopatógenos Gram-positivos y Gram-negativos, siendo destacable que todas las cepas ejercieron actividad antimicrobiana directa frente a, al menos, cuatro de los ocho microorganismos empleados como indicadores. La inhibición de microorganismos patógenos por bacterias lácticas ha sido descrita con anterioridad y puede ser debida a la producción de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, siendo considerada esta característica como una propiedad deseable en las cepas probióticas que pretenden emplearse en acuicultura como alternativa al uso de los antibióticos (Ringø y Gatesoupe, 1998; Gatesoupe, 2008).

Con el objeto de identificar las cepas cuya actividad antimicrobiana no era debida a la competencia por los sustratos del medio de cultivo ni al descenso del pH producido como consecuencia de su metabolismo fermentativo, sino a la producción de bacteriocinas, 49 bacterias lácticas seleccionadas por su actividad antimicrobiana directa se desarrollaron en medio líquido y se obtuvieron los correspondientes sobrenadantes libres de células de los cultivos ajustados a pH 6,2 que se esterilizaron por filtración (en adelante, sobrenadantes) para, posteriormente, evaluar su actividad antagonista mediante la técnica de difusión en agar (TDA) (Cintas *et al.*, 1995) frente a tres microorganismos indicadores (*P. damnosus* CECT4797, *L. garvieae* JIP29-99 y *A. hydrophila* CECT5734). La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes se cuantificó determinando el diámetro de los halos de inhibición producidos y los resultados obtenidos (Tabla 3; Capítulo III) mostraron que un elevado número de cepas (24; 49%) presentaron actividad antimicrobiana en los sobrenadantes de sus cultivos. La actividad antimicrobiana de estos sobrenadantes fue sensible a la acción de la enzima proteinasa K, pero no al tratamiento térmico, revelando la naturaleza proteica y termorresistente de los compuestos secretados (*i.e.*, bacteriocinas). La capacidad de producir bacteriocinas ha sido propuesta como una propiedad de interés durante la selección de bacterias lácticas para ser utilizadas como probióticos en acuicultura como alternativa a los antibióticos para controlar las infecciones de origen bacteriano (Desriac *et al.*, 2010), al igual que se ha propuesto para los probióticos destinados a humanos y animales terrestres (Corr *et al.*, 2007; Gillor *et al.*, 2008; O'Shea *et al.*, 2012). A este respecto, varios estudios han demostrado la eficacia de la producción de bacteriocinas por bacterias lácticas probióticas como principal mecanismo de acción frente a diversas infecciones empleando modelos murinos (Corr *et al.*, 2007; Millette *et al.*, 2008). Asimismo, Schubiger *et al.* (2015) demostraron que la entericidina producida por la cepa Gram-negativa *Enterobacter* sp. C6-6 era necesaria para la protección de la trucha arcoíris frente a la enfermedad del agua fría originada por *F. psychrophilum*. Recientemente nuestro grupo investigador ha demostrado que la producción de nisina Z por la cepa *L. cremoris* WA2-67 constituye el principal mecanismo de acción en la protección de la trucha arcoíris frente a la lactococosis originada por el agente zoonótico *L. garvieae* (Araújo *et al.*, 2013, 2015b). Es importante

mencionar que en el cultivo de peces la lactococosis es una enfermedad que causa septicemia hemorrágica y meningoencefalitis y es considerada como una de las principales enfermedades que afecta a peces continentales y marinos, originando importantes pérdidas económicas (Vendrell *et al.*, 2006). Asimismo, *L. garvieae* es considerado como un patógeno emergente para el hombre (Chan *et al.*, 2011). En este sentido, nuestro trabajo muestra que las bacterias lácticas bacteriocinogénicas activas frente a este patógeno son comunes entre la microbiota aislada de peces y productos de la pesca (10 cepas, 20%).

IX. 2. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD *in vitro* DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO

La aplicación de probióticos en acuicultura puede modificar la ecología microbiana de los hospedadores acuáticos y la de su medio ambiente, por lo que la evaluación de su seguridad para la especie en la que se pretende utilizar, el hombre y el medio ambiente es de gran importancia (Decamp y Moriarty, 2007). Hasta la fecha, varios estudios han descrito el proceso de selección de bacterias lácticas como posibles candidatos probióticos para la acuicultura (Nikoskelainen *et al.*, 2001a; Balcázar *et al.*, 2008; Merrifield *et al.*, 2010b; Dimitroglou *et al.*, 2011); sin embargo, la evaluación de la seguridad de las cepas está generalmente limitada a ensayos *in vivo* en el hospedador para confirmar así su ausencia de patogenicidad en la especie acuática correspondiente (Decamp y Moriarty, 2007; Wang *et al.*, 2008a; Das *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, 2010b; Dimitroglou *et al.*, 2011; Olmos *et al.*, 2011). Conviene destacar que de forma general, los estudios sobre la evaluación de la seguridad *in vitro* no se suelen realizar, a pesar de su bajo coste económico e implicaciones éticas y de que resultan muy efectivos para evaluar simultáneamente la seguridad de un amplio número de cepas, no sólo para la especie hospedadora sino también para el hombre y el medio ambiente.

De acuerdo con la EFSA (2011), la mayoría de las especies de bacterias lácticas estudiadas en este trabajo (*P. pentosaceus*, *Lb. curvatus*, *L. lactis* y *Lc. mesenteroides*) están incluidas en la lista QPS y, por tanto, la demostración de su seguridad sólo requiere la confirmación de la ausencia de genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica en medicina humana y veterinaria. Por otra parte, es importante mencionar que hasta el momento no hay guías sobre la evaluación de la seguridad de la especie *W. cibaria*. En este trabajo se evaluó la seguridad *in vitro* de las bacterias lácticas empleando un protocolo de evaluación de la seguridad más exhaustivo que el establecido por la EFSA para las bacterias lácticas con estatus QPS (EFSA, 2005a, 2005b, 2007, 2008b, 2011, 2012b) utilizando varios ensayos microbiológicos y genéticos *in vitro*.

IX.2.1. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE FACTORES DE VIRULENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE IMPORTANCIA CLÍNICA EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las especies de bacterias lácticas estudiadas en este trabajo presentan el estatus QPS y, por lo tanto, la demostración de su seguridad sólo requiere la confirmación de la ausencia de genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica en medicina humana y veterinaria (EFSA, 2011). Sin embargo, en el caso de los enterococos es necesario realizar un estudio más exhaustivo para cada cepa con el objetivo de evaluar el riesgo de su uso intencionado en la cadena alimentaria. En este sentido, los enterococos se consideran microorganismos patógenos humanos oportunistas emergentes ya que causan infecciones nosocomiales (Klare *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2003, 2010; Kayser, 2003). Asimismo, la seguridad de los enterococos también está muy cuestionada debido a la posible presencia de factores de virulencia específicos, que pueden estar asociados con una o varias de las etapas de la infección. En este contexto, la mayoría de los factores de virulencia descritos hasta la fecha son productos de secreción (*e.g.*, citolisina y gelatinasa) o factores de adhesión localizados en la superficie de las bacterias (*e.g.*, sustancia de agregación y proteína de superficie de los enterococos) (Eaton y Gasson, 2001; Garza-Velasco *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Koch *et al.*, 2004; Majhenič *et al.*, 2005; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ogier y Serror, 2008).

Los resultados obtenidos para los 59 enterococos evaluados en este trabajo (21 *E. faecalis* y 38 *E. faecium*) (Capítulo III) mostraron que las cepas de *E. faecalis* presentaban un mayor porcentaje de genes que codifican la síntesis de factores de virulencia que las cepas de *E. faecium*, como ya había sido descrito por otros autores (Eaton y Gasson, 2001; Gomes *et al.*, 2008; López *et al.*, 2009). A este respecto, la mayoría de *E. faecalis* (95%) y un alto porcentaje de *E. faecium* (53%) presentaron, al menos, un factor de virulencia, siendo *efaAfs* (95 y 45%, respectivamente), *gelE* (71 y 24%, respectivamente) y *agg* (67 y 8%, respectivamente), los genes que se detectaron más frecuentemente. Sólo una cepa de *E. faecalis* (*E. faecalis* SDP10) (5%) presentó el gen *cyl_Lcyl_Scyl_M* y mostró actividad hemolítica (Fig. 9.1A). Con respecto al gen *gelE*, que codifica la síntesis de una metaloendopeptidasa extracelular capaz de degradar sustratos como la gelatina, el colágeno, la caseína, la hemoglobina y péptidos de pequeño tamaño con actividad biológica, se detectó en un alto porcentaje de *E. faecalis* (71%), que mostraron además actividad gelatinasa en las pruebas fenotípicas (Fig. 9.1B). Sin embargo, cinco de las nueve cepas de *E. faecium* (55,6%) que presentaron el gen *gelE*, no presentaron actividad gelatinasa en placa, lo que sugiere la existencia de mutaciones en estos genes estructurales y/o inactividad biológica de algún gen(es) de su operón como también se ha descrito en otros estudios (Eaton y Gasson, 2001; Gomes *et al.*, 2008). Asimismo, *E. faecium* P68 y *E. faecium* GM29 presentaron *cyl_Lcyl_S* pero no actividad hemolítica (Fig. 9.1A), lo que podría explicarse por la

ausencia de *cylM*, cuyo producto interviene en la modificación postraducciona de la citolisina. Por otra parte, los genes *esp* e *hyl*, que codifican una proteína de superficie de los enterococos asociada a una isla de patogenicidad y una proteína inicialmente descrita como una hialuronidasa, y que recientemente ha sido anotada como una hipotética glicosil hidrolasa que facilita la colonización intestinal en humanos y animales (Freitas *et al.*, 2010), respectivamente, no se detectaron en ninguna de las cepas enterococales evaluadas empleando los cebadores descritos por Eaton y Gasson (2001) y Vankerckhoven *et al.* (2004), respectivamente.

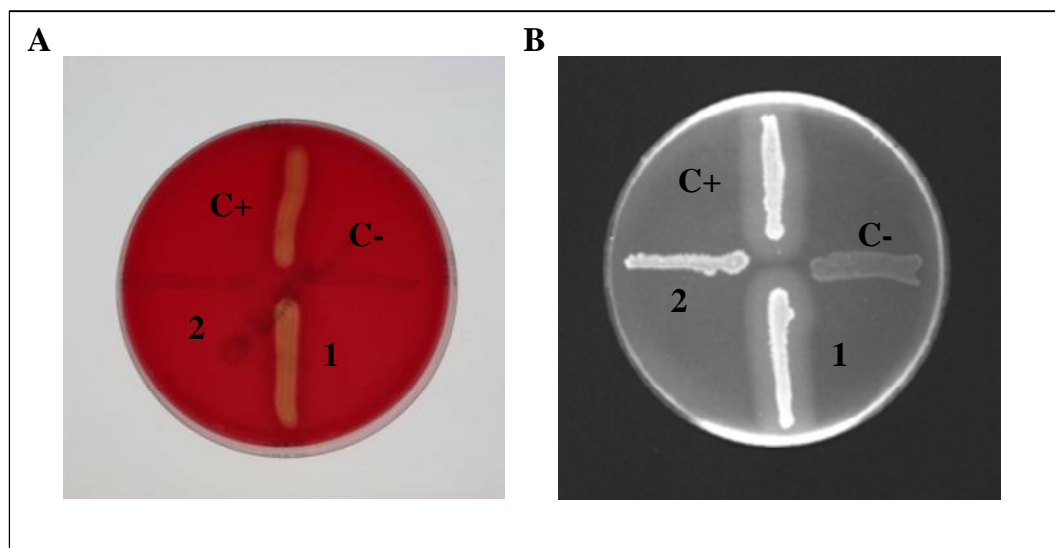


Figura 9.1. Evaluación fenotípica de la actividad hemolítica en Columbia agar con sangre de caballo (5%, v/v) (A) y actividad gelatinasa en Todd-Hewitt agar con gelatina (3%, p/v) (B) de enterococos de origen acuático. (1) *E. faecalis* SDP10 y (2) *E. faecium* GM29. C+: control positivo de actividad hemolítica y gelatinasa (*E. faecalis* P4); C-: control negativo de actividad hemolítica y gelatinasa (*E. faecalis* P36). Fuente: Imágenes del autor.

Por otra parte, los enterococos poseen un amplio espectro de resistencias naturales (intrínsecas) y adquiridas (transferibles) a antibióticos, además de su resistencia a diversos factores físico-químicos (*e.g.*, bajo pH y altas temperaturas y concentraciones de sal) y condiciones ambientales adversas (Eaton y Gasson, 2001; Klare *et al.*, 2001; Ogier y Serror, 2008). En este contexto, la supervivencia de los enterococos en el ambiente hospitalario está relacionada con: (i) su resistencia natural a diversos detergentes utilizados en la desinfección y diversos antibióticos de uso común en terapia humana y (ii) su capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos. Además, el incremento en el empleo de antibióticos de amplio espectro en el tratamiento de diversas infecciones ha provocado la selección de enterococos resistentes a antibióticos (ARE, del inglés *Antibiotic Resistant Enterococci*), en algunos casos multirresistentes, y, por lo tanto, origina un aumento de la incidencia de las infecciones nosocomiales causadas por enterococos (Klare *et al.*, 2003). Por todo ello, en la actualidad existe una gran controversia sobre la utilización de los enterococos en la industria alimentaria, principalmente de la especie *E. faecalis*, especialmente en lo que respecta a su posible resistencia a los glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) (VRE, del inglés *Vancomycin Resistant Enterococci*)

(Eaton y Gasson, 2001; de Vuyst *et al.*, 2003; Franz *et al.*, 2010). En este contexto, se ha descrito que pueden aislarse de los alimentos enterococos resistentes a antibióticos (Pavia *et al.*, 2000; Giraffa, 2002; de Vuyst *et al.*, 2003; Ben Omar *et al.*, 2004; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006); no obstante, conviene destacar que diversos autores han descrito que los enterococos de origen alimentario, principalmente de la especie *E. faecium*, muestran generalmente una sensibilidad a los antibióticos significativamente mayor que las cepas de origen clínico (Aguirre y Collins, 1993; Eaton y Gasson, 2001; de Vuyst *et al.*, 2003; Ben Omar *et al.*, 2004; Silva-Lopes *et al.*, 2005; Hummel *et al.*, 2007b; Ogier y Serror, 2008; Vankerckhoven *et al.*, 2008). A pesar de esta controversia creciente e incesante sobre la utilización de los enterococos en la industria alimentaria, conviene destacar que los alimentos que contienen enterococos de forma natural se han consumido durante siglos sin riesgos aparentes para la salud humana (Giraffa, 1995; Eaton y Gasson, 2001; Lauková, 2012). Asimismo, algunas cepas de *E. faecium* se utilizan como cultivos iniciadores, protectores, adjuntos y/o probióticos para la elaboración de diversos alimentos (principalmente productos lácteos) (Franz *et al.*, 2003; Vankerckhoven *et al.*, 2008; Lauková, 2012) y otras cepas están autorizadas por la EFSA como aditivos zootécnicos para la alimentación de terneros, lechones, cerdos, pollos y pavos de engorde (Reglamento CE N° 1831/2003, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal).

Actualmente, los antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones clínicas causadas por ARE son la ampicilina, gentamicina y vancomicina, siendo destacable el hecho de que el empleo extensivo de vancomicina ha provocado un aumento de VRE. A este respecto, se han descrito hasta la fecha seis fenotipos distintos de resistencia a la vancomicina, cinco adquiridos y uno natural o intrínseco. VanA es el fenotipo de mayor importancia clínica ya que se encuentra ampliamente distribuido en el género *Enterococcus*, principalmente en *E. faecium*, y confiere resistencia a la vancomicina, teicoplanina y avoparcina. VanB es el segundo fenotipo en importancia y las cepas que lo poseen muestran resistencia a niveles variables de vancomicina, aunque todas ellas son susceptibles a la teicoplanina. El fenotipo VanC es intrínseco de *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*, y confiere resistencia a bajos niveles de vancomicina. Finalmente, los fenotipos VanD, VanE y VanG son de menor relevancia clínica y sólo se han descrito en algunas cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* (Franz *et al.*, 1999; Kayser, 2003; Klare *et al.*, 2003; Ogier y Serror, 2008; Xu *et al.*, 2010). De forma natural, los enterococos son resistentes a los siguientes antibióticos: (i) penicilinas semisintéticas resistentes a β -lactamasas; (ii) ácido nalidíxico; (iii) bajos niveles de aminoglucósidos; (iv) cefalosporinas; (v) estreptograminas (exclusivamente *E. faecalis*); (vi) fluoroquinolonas; (vii) bajos niveles de glicopéptidos (exclusivamente *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*); (viii) bajos niveles de lincosamidas; (ix) monobactams; (x) polimixinas y (xi) sulfonamidas (Witte *et al.*, 1999; Cetinkaya *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2003; Marothi *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2010). Por otra parte, los enterococos pueden adquirir resistencia a diversos antibióticos, tales como: (i) β lactámicos; (ii) ácido fusídico; (iii) altos

niveles de aminoglucósidos; (iv) cloranfenicol; (v) estreptograminas; (vi) evernimomicinas; (vii) glicopéptidos; (viii) lincosamidas; (ix) macrólidos; (x) nitrofurantoína; (xi) oxazolidinonas; (xii) quinolonas; (xiii) rifampicina; (xiv) tetraciclinas, y (xv) trimetoprim (Witte *et al.*, 1999; Cetinkaya *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2003; Marothi *et al.*, 2005; Franz *et al.*, 2010). A este respecto, los principales mecanismos de resistencia adquirida a antibióticos son la acumulación de mutación(es) en diversos genes cromosómicos y la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia conjugativa desde cepas donadoras, y ambos procesos son consecuencia de la intensa presión selectiva derivada del empleo, muchas veces abusivo, de los antibióticos como agentes terapéuticos y profilácticos en medicina humana y veterinaria (Klare *et al.*, 2003; Franz *et al.*, 2010). Nuestros resultados revelaron que 39 cepas enterococales (66%) presentaron resistencias adquiridas a antibióticos (Tabla 2; Capítulo III) empleando la técnica de disco sobre agar (Bauer *et al.*, 1966), actualizada y modificada por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011) (Fig. 9.2). Conviene destacar que los resultados de resistencias adquiridas a antibióticos para *E. faecium* (68,4%) y *E. faecalis* (62%) fueron similares; sin embargo, los porcentajes de resistencia a ciprofloxacino, norfloxacino, rifampicina y/o glicopéptidos fueron mayores en *E. faecalis* (57,1% vs. 26,3%). Por el contrario, el porcentaje de resistencia a eritromicina fue mayor en *E. faecium* (37%), ya que sólo se detectó resistencia a este antibiótico en una cepa de *E. faecalis* (5%). Además, se encontraron resistencias a múltiples antibióticos en ambas especies (37%). A pesar de la alta prevalencia de resistencias adquiridas encontradas en los enterococos de origen acuático, estos mostraron baja prevalencia de resistencia a la vancomicina (8,5%) o ausencia de resistencias a otros antibióticos de relevancia clínica como la ampicilina, penicilina y gentamicina, lo que está en concordancia con los resultados de otros autores (Gomes *et al.*, 2008; Ogier y Serror, 2008).

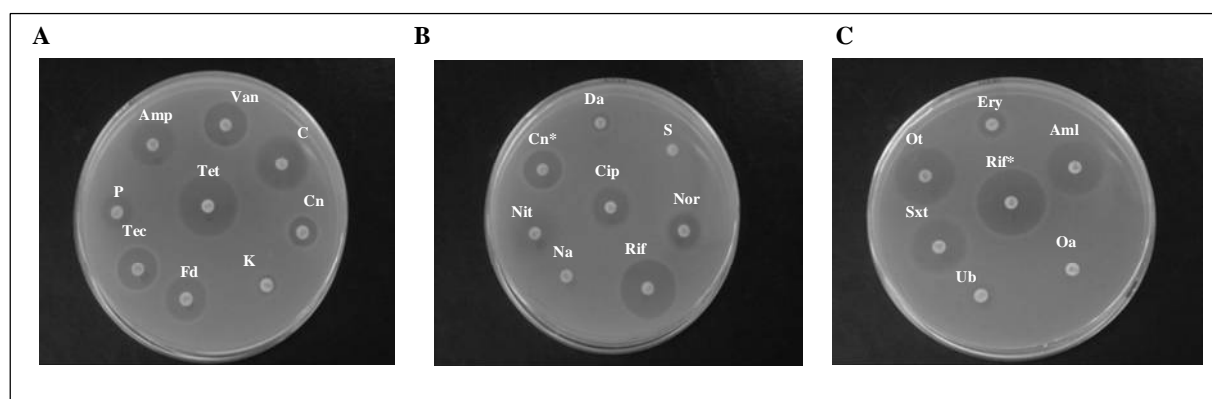


Figura 9.2. Evaluación de la susceptibilidad de *E. faecium* NV54 frente a 22 antibióticos de importancia clínica en medicina humana y veterinaria empleando la técnica de disco sobre agar (CLSI, 2011). (A) Van (vancomicina, 30 µg), Amp (ampicilina, 10 µg), C (cloranfenicol, 30 µg), Tet (tetraciclina, 30 µg), P (penicilina, 10 µg), Cn (gentamicina, 10 µg), Tec (teicoplanina, 30 µg), Fd (ácido fusídico, 10 µg), K (kanamicina, 30 µg). (B) Da (clindamicina, 2 µg), Cn* (gentamicina, 120 µg), S (estreptomicina, 10 µg), Cip (ciprofloxacino, 5 µg), Nit (nitrofurantoína, 300 µg), Nor (norfloxacino, 10 µg), Na (ácido nalidíxico, 30 µg), Rif (rifampicina, 5 µg). (C) Ery (eritromicina, 15 µg), Ot (oxitetraciclina, 30 µg), Aml (amoxicilina, 25 µg), Rif* (rifampicina, 30 µg), Sxt (trimetoprim-sulfametoxazol, 25 µg), Ub (flumequina, 30 µg) y Oa (ácido oxolínico, 2 µg). Fuente: Imágenes del autor.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las 21 cepas de *E. faecalis* se descartaron para posteriores estudios dado que poseen factores de virulencia (8 cepas, 38%), resistencias a antibióticos adquiridas (1 cepa, 5%) o ambos fenotipos (12 cepas, 57%). Con respecto a *E. faecium*, 29 cepas (76%) se descartaron por la presencia de factores de virulencia (3 cepas, 8%), resistencias a antibióticos adquiridas (9 cepas, 24%) o ambos fenotipos (17 cepas, 45%). Por lo tanto, tan solo 9 cepas de *E. faecium* (24%) se consideraron potencialmente seguras para su posterior evaluación.

Conviene destacar que la EFSA publicó en 2012 sendas guías sobre la evaluación de la seguridad de *E. faecium* en nutrición animal (2012a) y sobre la evaluación de la susceptibilidad de bacterias a antibióticos de importancia en medicina humana y veterinaria (2012b). De acuerdo con el primer documento, para diferenciar las cepas de *E. faecium* seguras para su empleo en nutrición animal de aquellas de origen clínico (responsables de infecciones humanas) es necesario evaluar su susceptibilidad a la ampicilina y la ausencia de tres marcadores genéticos frecuentemente asociados a los enterococos de origen clínico (*i.e.*, el elemento genético móvil *IS16* y los genes *esp* e *hyl_{Efm}*) empleando cebadores específicos (EFSA, 2012a). Según este documento, ninguna cepa de *E. faecium* resistente a la ampicilina o que posea alguno de los tres marcadores genéticos de virulencia previamente mencionados debe emplearse como aditivo en alimentación animal. Conviene destacar que en los últimos años, nuestro grupo de investigación ha aislado y caracterizado un gran número de cepas de *E. faecium*, incluyendo cepas productoras de bacteriocinas (bacteriocinogénicas) de distintos orígenes, como productos cárnicos (Cintas *et al.*, 1995; Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997), animales salvajes y de caza (Martín *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2007) y pescado, marisco y productos de la pesca (Almeida *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2015a; Gómez-Sala *et al.*, 2015). Debido a sus interesantes propiedades biotecnológicas, algunas de estas cepas y/o sus metabolitos, incluyendo 14 enterococos, se consideran candidatos potenciales para su aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica o como probióticos en alimentación animal. A este respecto, en este trabajo se evaluó la seguridad *in vitro* de estas 14 cepas de *E. faecium*, incluyendo 11 cepas aisladas de pescado y productos de la pesca (entre las que se incluyen 9 cepas seleccionadas previamente; Capítulo III) y 3 cepas aisladas de embutidos crudos curados, empleando el método de microdilución para la evaluación de la Concentración Mínima Inhibidora (CMI) a la ampicilina y los cebadores propuestos por la EFSA (2012a) para la detección de los genes *esp*, *hyl_{Efm}* e *IS16*. Nuestros resultados mostraron que ninguno de los enterococos evaluados presentaba estos marcadores de virulencia y que todas las cepas fueron susceptibles a la ampicilina (Capítulo V) de acuerdo al punto de corte ($CMI \leq 2$ mg/l) establecido por la EFSA (2012a). Estudios previos han propuesto al elemento móvil *IS16*, designado como una transposasa mutacional, como un marcador específico para identificar cepas de *E. faecium* asociadas a ambientes hospitalarios (Leavis *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2011). La ausencia del marcador *IS16* en los enterococos de origen alimentario evaluados en este trabajo está en concordancia con los resultados obtenidos por Werner *et al.* (2011), quienes sugirieron la presencia de plásmidos portadores de este

elemento en enterococos de origen hospitalario. El gen de virulencia *esp* ha sido localizado en una isla de patogenicidad (Leavis *et al.*, 2004) y recientemente se ha propuesto denominarla como un elemento conjugativo integrativo (ICE*EfmI*) por ser móvil y auto-transmisible (Top *et al.*, 2011). Estudios previos han asociado la producción de Esp por cepas de *E. faecium* con la formación de biopelículas (Heikens *et al.*, 2007), infecciones del tracto urinario (Leendertse *et al.*, 2009) y endocarditis (Heikens *et al.*, 2011). Por otra parte, el gen *hyl_{Efm}* está localizado en un megaplásmido transferible en cepas de *E. faecium* de origen hospitalario (Freitas *et al.*, 2010). Un estudio previo demostró que la adquisición del plásmido portador de *hyl_{Efm}* por la cepa *E. faecium* D344SRF (sin capacidad de colonización) a partir de la cepa *E. faecium* C68 de origen clínico promovió su colonización en el tracto gastrointestinal de ratones (Rice *et al.*, 2009). La ausencia de estos genes (*esp* e *hyl_{Efm}*) en las cepas de origen alimentario aisladas por nuestro grupo investigador está en concordancia con un estudio previo en el que ninguna cepa de *E. faecium* utilizada comercialmente como probiótico presentaba estos factores de virulencia (Vankerckhoven *et al.*, 2008). Estudios anteriores han puesto de manifiesto que los genes *esp* e *hyl_{Efm}* se encuentran más frecuentemente en cepas de *E. faecium* resistentes a la vancomicina y ampicilina que en cepas de *E. faecium* resistentes a la vancomicina y sensibles a la ampicilina (Vankerckhoven *et al.*, 2004). De hecho, el incremento de la incidencia de enterococos implicados en brotes hospitalarios se ha atribuido a la diseminación de cepas de *E. faecium* resistentes a la vancomicina y ampicilina que presentan los genes de virulencia *esp* y/o *hyl_{Efm}* (Klare *et al.*, 2005a; Vankerckhoven *et al.*, 2008; Werner *et al.*, 2008). Así pues, el hecho de que las cepas de *E. faecium* evaluadas en este estudio no presentaran estos genes de virulencia (*esp* e *hyl_{Efm}*) puede estar relacionado con su origen no clínico.

El uso y frecuente abuso de antibióticos en el cultivo de peces, incluyendo los que se utilizan en medicina humana, ha propiciado la aparición y transferencia de resistencias microbianas en ambientes acuícolas. Este hecho conlleva un alto riesgo para la salud animal y humana, debido al incremento de resistencias antimicrobianas adquiridas en los ictiopatógenos, la transferencia de determinantes genéticos a patógenos de animales terrestres y del hombre y la modificación de la microbiota del medio ambiente acuático (EC, 2003; Das *et al.*, 2010). Por ello, en este trabajo también se evaluó la susceptibilidad (CMI) de los 9 *E. faecium* seleccionados anteriormente a los principales antibióticos empleados en medicina humana y veterinaria (EFSA, 2012b) empleando para ello placas de microdilución VetMIC (*National Veterinary Institute*, Uppsala, Suecia) (Capítulo III). A este respecto, ninguna cepa de *E. faecium* presentó resistencia a la ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina, excepto *E. faecium* BNM58, que presentó resistencia a la eritromicina (CMI = 8 mg/l). A pesar de la resistencia fenotípica a la eritromicina encontrada en esta cepa, no se detectó la presencia de ninguno de los genes *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C) o *mef*(A/E). Sin embargo, podrían estar presentes en esta cepa otros mecanismos de

resistencia, como la inactivación enzimática de este antibiótico por varias eritromicina-esterasas que están codificadas por los genes *ere(A)* o *ere(B)*.

Del mismo modo que para las cepas enterococales, también se evaluó la susceptibilidad a antibióticos de las 40 bacterias lácticas no enterococales (Capítulo III). Los resultados obtenidos se interpretaron de acuerdo con los criterios de evaluación de resistencias bacterianas a antibióticos establecidos por la EFSA (2012b). A este respecto, los puntos de corte para el género *Weissella*, considerado similar al género *Leuconostoc*, no están incluidos en este documento, por lo que en nuestro trabajo se emplearon los puntos de corte descritos para el género *Leuconostoc*. Además, debido a la ausencia de puntos de corte para la penicilina y linezolid para las bacterias lácticas en el documento de la EFSA (2012b), los resultados obtenidos para estos antibióticos se interpretaron utilizando los puntos de corte propuestos por Klare *et al.* (2007) para los pediococos. De acuerdo con nuestros resultados, los porcentajes de cepas que presentaron resistencias a antibióticos en el género *Weissella*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* fueron del 60, 44 y 33%, respectivamente, mientras que ninguna cepa de los géneros *Leuconostoc* y *Lactococcus* presentó resistencia a antibióticos. Además, la resistencia a múltiples antibióticos fue infrecuente entre las cepas no enterococales (5%). Nuestros resultados indican que los patrones de susceptibilidad a los antibióticos de relevancia clínica son especie-dependientes, como han descrito otros autores (Danielsen y Wind, 2003; Vay *et al.*, 2007).

De acuerdo con la EFSA (2012b), la detección de una CMI para uno o más antibióticos por encima de los puntos de corte establecidos requiere diferenciar entre la adquisición de determinantes genéticos transmisibles y una posible mutación en un gen interno. En nuestro trabajo se detectó un bajo número de resistencias adquiridas debidas a la adquisición de determinantes genéticos (7,5%). En este sentido, sólo se encontraron resistencias adquiridas transmisibles en los géneros *Pediococcus* (12,5%) y *Weissella* (6,7%). A pesar de que *P. pentosaceus* LPV57 y *P. pentosaceus* LPM78 mostraron resistencia a la kanamicina (CMI = 128 mg/l), no se detectó el gen de resistencia *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* en estas cepas. De forma similar, *P. pentosaceus* TPP3 y *P. pentosaceus* SMF120 fueron fenotípicamente resistentes a la tetraciclina (CMI = 16 mg/l), pero no presentaron los genes de resistencia *tet(K)*, *tet(L)* o *tet(M)*. A este respecto, Ammor *et al.* (2007) describieron que los pediococos son intrínsecamente resistentes a la kanamicina y la tetraciclina, así como a glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina), estreptomina, ciprofloxacino y trimetoprim-sulfametoxazol. Otros autores propusieron una CMI para la tetraciclina comprendida entre 8 y 16 mg/l en pediococos (Danielsen *et al.*, 2007), o de 32 mg/l para la oxitetraciclina en *P. pentosaceus* (Klare *et al.*, 2007). Conviene destacar que los puntos de corte propuestos por la EFSA (2012b) son más bajos que los valores de CMI observados en nuestro trabajo y los de otros autores (Danielsen *et al.*, 2007; Klare *et al.*, 2007), lo que sugiere una posible resistencia intrínseca de los pediococos a este antibiótico. Por otra parte, la única resistencia detectada en las cepas del género *Leuconostoc* fue a la vancomicina, si bien se trata de una resistencia intrínseca. Previamente se ha descrito que las cepas de este género presentan

pocas o ninguna resistencias a los antibióticos de interés clínico (Ogier *et al.*, 2008). Con respecto a los lactococos, las tres cepas de *L. lactis* subesp. *cremoris* evaluadas fueron susceptibles a todos los antibióticos; sin embargo, se detectaron CMI relativamente elevadas para la rifampicina (16–32 mg/l) y trimetoprim (≥ 64 mg/l). De hecho, se ha descrito que la mayoría de las especies del género *Lactococcus* son resistentes al trimetoprim (Ammor *et al.*, 2007). Asimismo, la mayoría de las cepas heterofermentativas del género *Lactobacillus* fueron resistentes a la vancomicina pero susceptibles al resto de los antibióticos evaluados, excepto *Lb. carnosus* B43, que mostró la CMI más alta para la ampicilina y penicilina (CMI = 8 y 4 mg/l, respectivamente). En este contexto, la presencia de modificaciones en la proteína de unión a la penicilina (PBP, del inglés *Penicillin-Binding Protein*) que confiere resistencia a este antibiótico y otros β -lactámicos, se ha demostrado en *E. faecium* y *Streptococcus pneumoniae* (Klare *et al.*, 2003; Albarracín Orio *et al.*, 2011). Además, se han descrito nueve PBP en *Lb. casei* ATCC393 (Piuri *et al.*, 2005), lo que sugiere que la resistencia a la ampicilina y penicilina encontrada en *Lb. carnosus* B43 pueda ser debido a este mecanismo de resistencia. La resistencia intrínseca a la vancomicina detectada en los géneros *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* se debe a la presencia en el peptidoglicano de su pared de D-Ala-D-lactato en lugar del dipéptido D-Ala-D-Ala (Klein *et al.*, 2000). En este contexto, todas las cepas de *W. cibaria* mostraron valores de CMI ≥ 128 mg/l para la vancomicina, lo que permite sugerir que la resistencia a este antibiótico también es una característica intrínseca en esta especie. En lo que respecta a *Weissella* spp., los estudios de susceptibilidad a los antibióticos son muy limitados (Ayeni *et al.*, 2011) y, como se ha mencionado anteriormente, no existen puntos de cortes definidos por la EFSA. En nuestro estudio, la mayoría de las cepas de *W. cibaria* mostraron CMI bajos; sin embargo, *W. cibaria* BCS50 mostró una CMI relativamente alta para la penicilina (8 mg/l) y kanamicina (64 mg/l) y *W. cibaria* SMA25 mostró valores de CMI de 128 mg/l para la kanamicina, 8 mg/l para la gentamicina, eritromicina y neomicina, y 2 mg/l para la clindamicina. Así pues, estas dos cepas fueron descartadas para posteriores estudios y *W. cibaria* P50, P61, P64, P73, SMA14, SDM381 y SDM389 tampoco se incluyeron en la selección final por presentar CMI altas para la kanamicina (32–64 mg/l). De acuerdo con nuestros resultados, y como regla general, en este trabajo se propone utilizar los puntos de corte de *Leuconostoc* spp. establecidos por la EFSA (2012b) para determinar la susceptibilidad a antibióticos de *W. cibaria* hasta que se realicen más estudios que establezcan rangos de CMI para esta especie. No obstante, conviene destacar que en este trabajo se encontraron diferencias en las CMI para la rifampicina y trimetoprim entre *W. cibaria* y *Lc. mesenteroides*. A este respecto, la reducida susceptibilidad de *W. cibaria* al trimetoprim podría indicar una resistencia intrínseca a este antibiótico (Ayeni *et al.*, 2009). Por otra parte, en este trabajo sólo se detectaron por PCR los genes de resistencia *mef*(A/E), que codifica la síntesis de una bomba de eflujo que confiere un nivel de resistencia de bajo a moderado a macrólidos (eritromicina, claritromicina y azitromicina) pero no a lincosamidas o estreptograminas B (del Grosso *et al.*, 2002), y *lnu*(A), que codifica la síntesis de la lincosamida O-nucleotidiltransferasa que inactiva

la lincomicina y la clindamicina (Bozdogan *et al.*, 1999). En este sentido, *P. pentosaceus* LPM78 y *W. cibaria* SMA25, que mostraron resistencia a la eritromicina (CMI = 8 y ≥ 8 mg/l, respectivamente), presentaron el gen *mef*(A/E) que se ha descrito previamente en una gran variedad de bacterias Gram-positivas, incluyendo corinebacterias, enterococos, micrococos y varias especies de estreptococos (Roberts *et al.*, 1999; Leclercq, 2002). Por otra parte, dos pediococos (*P. pentosaceus* LPM78 y LPM83) que mostraron resistencia a la clindamicina (CMI = 4 y 2 mg/l, respectivamente) presentaron el gen *lnu*(A), que ha sido previamente descrito en estafilococos, estreptococos, enterococos y lactobacilos de origen animal, así como en estafilococos aislados de humanos (Bozdogan *et al.*, 1999; Achard *et al.*, 2005). Sin embargo, las cepas *P. pentosaceus* LPP32, *P. pentosaceus* B5 y *W. cibaria* SMA25, resistentes a la clindamicina (CMI = 4 y 2 mg/l, respectivamente), no presentaron este gen ni tampoco *lnu*(B). Conviene destacar que esta es la primera descripción del gen *mef*(A/E) en los géneros *Pediococcus* y *Weissella*, así como de *lnu*(A) en el género *Pediococcus*. A este respecto, la detección de genes de resistencia a macrólidos y lincosamidas en cepas no enterococales sugiere una presencia de este tipo de genes mayor de la considerada hasta la fecha.

IX.2.2. DESCONJUGACIÓN DE SALES BILIARES, DEGRADACIÓN DE MUCINA Y EVALUACIÓN DE OTRAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PERJUDICIALES

En este trabajo se llevó a cabo la evaluación de la desconjugación de sales biliares, de la degradación de la mucina y de la presencia de otras actividades enzimáticas perjudiciales como la actividad β -glucuronidasa (Capítulo III), dado que estas actividades enzimáticas no deben presentarse en las cepas candidatas para ser empleadas como probióticos (Marteau *et al.*, 1995; Ruseler-van Embden *et al.*, 1995; Heavey y Rowland, 2004; Ruiz-Moyano *et al.*, 2009). En este sentido, una excesiva desconjugación de las sales biliares debida a un exceso de actividad hidrolasa de las sales biliares (BSH, del inglés *Bile Salt Hydrolase*) por parte de las cepas probióticas puede ser desfavorable en producción animal, ya que los ácidos biliares desconjugados son menos efectivos que los conjugados para la emulsificación de los lípidos de la dieta y, por lo tanto, para la asimilación de los piensos. Así pues, las sales biliares desconjugadas podrían disminuir la formación de micelas, digestión de lípidos y absorción de ácidos grasos y monoglicéridos (Begley *et al.*, 2005). De la misma manera, una excesiva degradación de la mucina puede ser perjudicial para el hospedador ya que facilitaría la translocación de las bacterias a los tejidos extraintestinales (Ruseler-van Embden *et al.*, 1995). A este respecto, es conveniente mencionar que ninguna de las 49 bacterias lácticas evaluadas, desconjugaron las sales biliares (Fig. 9.3), ni mostraron actividad mucinolítica (Fig. 9.4), ni hemolítica (sección IX.2.1; Capítulo III), lo que sugiere su bajo potencial invasivo y toxigénico para la barrera mucosa y el hospedador. Nuestros resultados referentes a la evaluación de la actividad mucinolítica de las bacterias lácticas de origen acuático coinciden con los descritos por Zhou *et al.* (2001) y Delgado *et al.* (2007),

quienes observaron que cepas de bacterias lácticas no degradaban la mucina empleando ensayos *in vitro* similares a los descritos en este trabajo. Por otra parte, la actividad β -glucuronidasa se ha asociado a la generación de metabolitos potencialmente carcinogénicos (Heavey y Rowland, 2004); sin embargo, conviene destacar que ninguna de las bacterias lácticas evaluadas en nuestro trabajo presentó esta actividad enzimática perjudicial.

Por último, varios estudios han sugerido que los probióticos pueden ejercer un efecto beneficioso en el proceso de digestión de los peces debido a la producción de enzimas extracelulares (Ringø *et al.*, 1995; Bairagi *et al.*, 2002; Ramírez y Dixon, 2003; Fjellheim *et al.*, 2010). En nuestro trabajo, las bacterias lácticas de origen acuático de los géneros *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* mostraron más actividades enzimáticas que los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella*, siendo los perfiles enzimáticos similares entre las cepas del mismo género. En este sentido, casi todas las cepas produjeron fosfatasas, que pueden estar involucradas en la absorción de nutrientes (Ramírez y Dixon, 2003), y peptidasas y glucosidasas, que degradan los péptidos y carbohidratos, respectivamente. Sin embargo, las bacterias lácticas mostraron baja actividad lipolítica y ninguna de ellas presentó las actividades tripsina y α -quimotripsina.

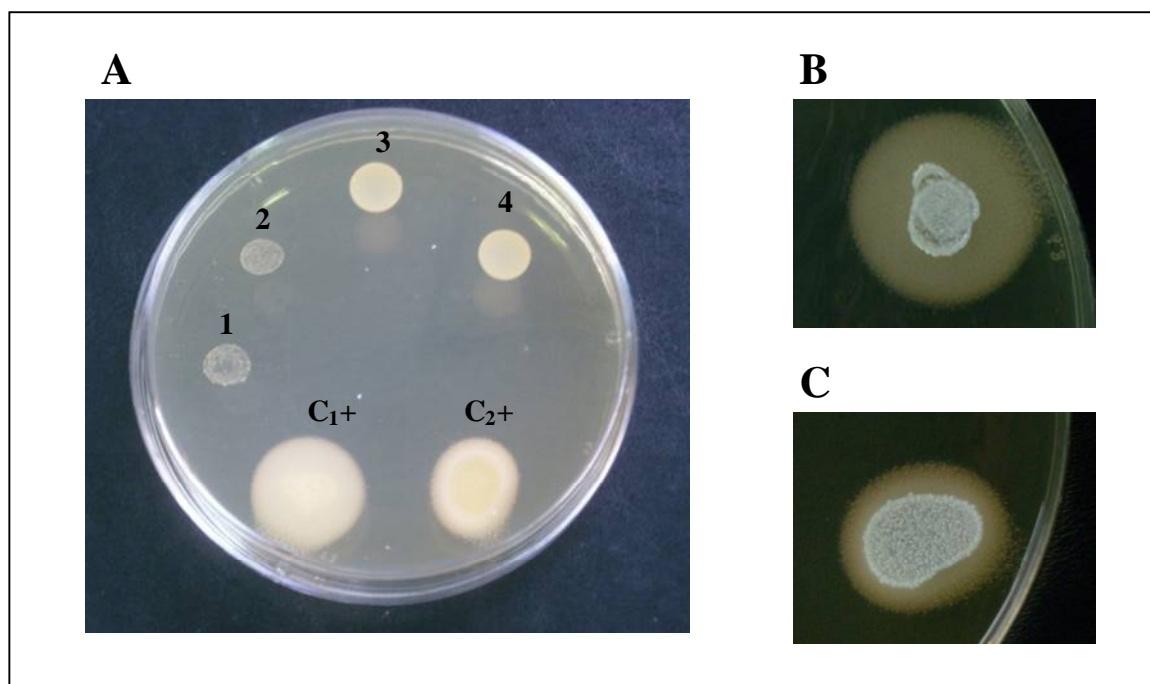


Figura 9.3. Evaluación fenotípica de la desconjugación de sales biliares por bacterias lácticas de origen acuático en MRS suplementado con L-cisteína y taurodeoxicolato. (A) *W. cibaria* BCS50 (1), *W. cibaria* P73 (2), *P. pentosaceus* B5 (3) y *E. faecium* CV1 (4). C₁+ y C₂+: controles positivos de actividad hidrolasa de sales biliares (microbiota fecal equina y canina, respectivamente). (B) Imagen ampliada de C₁+. (C) Imagen ampliada de C₂+. Fuente: Imágenes del autor.

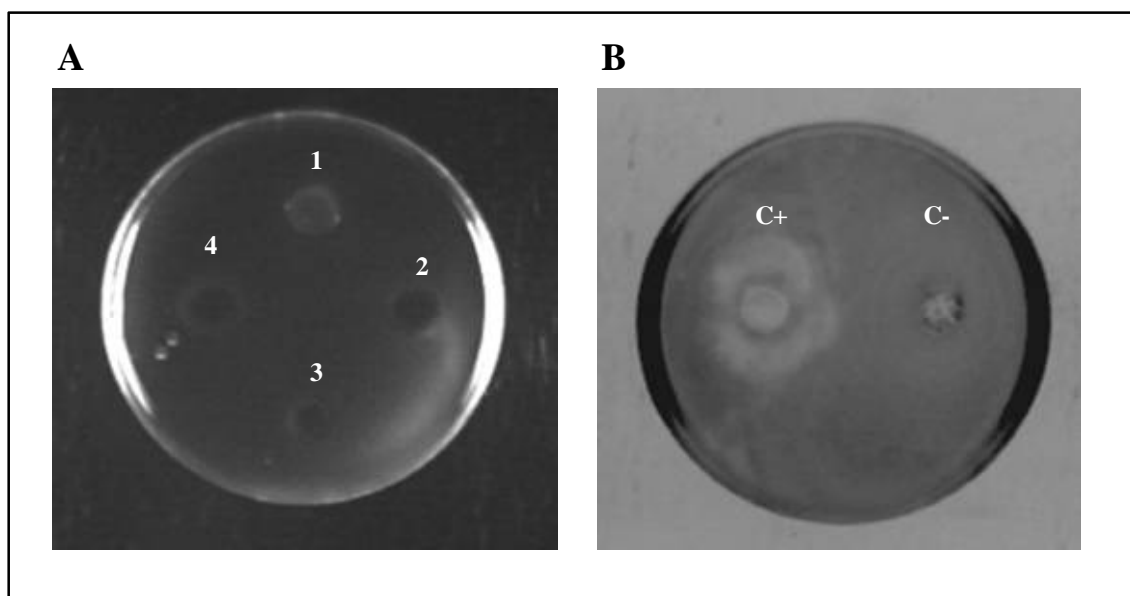


Figura 9.4. Evaluación fenotípica de la actividad mucinolítica de bacterias lácticas de origen acuático en placas con mucina. (A) *E. faecium* CV2 (1), *E. faecium* TPP2 (2), *P. pentosaceus* LPP32 (3) y *L. lactis* subesp. *cremoris* SMF161 (4). (B) C+: control positivo de actividad mucinolítica (microbiota fecal equina); C-: control negativo de actividad mucinolítica (*St. thermophilus* CECT801). Fuente: Imágenes del autor.

IX.2.3. PRODUCCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos (bases nitrogenadas) que aparecen en distintos alimentos como el pescado, el queso, el vino y otros productos fermentados y que se han relacionado con efectos toxicológicos moderadamente graves que se manifiestan como cuadros alérgicos (ten Brink *et al.*, 1990). Las principales aminas biógenas relacionadas con estos procesos son la histamina, la tiramina y la putrescina, que se forman por la descarboxilación enzimática de los aminoácidos precursores, histidina, tirosina y ornitina, llevada a cabo por las enzimas microbianas histidina descarboxilasa (HDC), tirosina descarboxilasa (TDC) y ornitina descarboxilasa (ODC), respectivamente (ten Brink *et al.*, 1990; Halász *et al.*, 1994). La presencia de aminas biógenas en alimentos no fermentados deriva principalmente de la actividad descarboxilasa de aminoácidos ejercida por bacterias contaminantes Gram-negativas (principalmente enterobacterias y *Pseudomonas* spp.) bajo condiciones de elevada temperatura y/o tiempo de almacenamiento, considerándose por tanto una característica indicadora de alteración. Por otra parte, en alimentos fermentados tales como el queso, el vino y los embutidos crudos curados, los principales responsables de la producción de estos compuestos, sintetizados durante el proceso de maduración o envejecimiento de estos productos, son las bacterias lácticas de, principalmente, los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (ten Brink *et al.*, 1990; Silla, 1996), que pueden encontrarse en el alimento bien como consecuencia de su adición como cultivos iniciadores o bien como constituyentes de su microbiota saprofita. Por lo tanto, las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores deben carecer de actividad descarboxilasa para evitar la formación de altas cantidades de aminas

biógenas en los productos fermentados. La histamina y la tiramina han sido muy estudiadas debido a sus efectos tóxicos derivados de sus propiedades vasoactivas y psicoactivas. La intoxicación por histamina, también denominada intoxicación por escómbridos por encontrarse frecuentemente vinculada al consumo de pescado de la familia *Scombridae* manipulado o almacenado de manera incorrecta (Hijano Baola *et al.*, 2005), se caracteriza por la aparición de hipotensión arterial, picor, enrojecimiento y edema facial, e incluso diarrea poco tiempo después del consumo del alimento (desde pocos minutos a algunas horas) (Lehane y Olley, 2000). A este respecto, conviene destacar que algunas especies de pescado están asociadas a un alto contenido de histidina (*e.g.*, atún, bonito, caballa, salmón, sardina y arenque), y por ello la UE, mediante el Reglamento (CE) N° 1441/2007, de la Comisión de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) N° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, ha establecido un límite máximo del contenido de histamina (200 mg/kg) para especies de pescado pertenecientes a las familias *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* y *Scombresosidae*. Por otra parte, la intoxicación alimentaria debida a tiramina, caracterizada fundamentalmente por cefaleas e hipertensión arterial, que pueden ir acompañadas de náuseas y vómitos, se asocia generalmente al consumo de alimentos fermentados, principalmente quesos madurados elaborados con leche cruda. La ingestión de estos productos por individuos particularmente sensibles, como por ejemplo los que reciben fármacos inhibidores de la enzima monoamino oxidasa (MAO) por vía oral como antidepresivos, puede desencadenar la denominada “reacción al queso”, consistente en una crisis hipertensiva que puede resultar en daño cardíaco y del sistema nervioso central (Blackwell, 1963; McCabe-Sellers *et al.*, 2006). En lo que respecta a la putrescina, su problemática radica en que potencia los efectos de la histamina debido a la interferencia con su sistema de detoxificación (Vidal-Carou *et al.*, 1990; Silla, 1996). Por otra parte, conviene destacar que la putrescina puede interaccionar con los nitritos presentes en ciertos alimentos para generar nitrosaminas, cuyo potencial carcinogénico, mutagénico y teratogénico es bien conocido (Silla, 1996; Ladero *et al.*, 2010).

IX.2.3.1. Evaluación de la producción de aminas biógenas mediante el empleo de pruebas fenotípicas y genotípicas

Actualmente, se dispone de diversas metodologías cualitativas y cuantitativas para determinar la producción de aminas biógenas, entre las que se incluyen ensayos en medio de cultivo sólido, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*), la cromatografía gas-líquido (GLC, del inglés *Gas-Liquid Chromatography*) y la cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin-Layer Chromatography*) (Coton y Coton, 2005; García-Moruno *et al.*, 2005; Costantini *et al.*, 2006; Landete *et al.*, 2007). En este trabajo se compararon tres metodologías, dos de tipo fenotípico (ensayos en medio de cultivo sólido y TLC) y una genotípica (PCR), para evaluar la producción de aminas biógenas y la presencia de los genes que codifican la síntesis de las enzimas

descarboxilasas, respectivamente, por 74 bacterias lácticas (34 enterococos y 40 cepas no enterococales) aisladas previamente de pescado, marisco y productos de la pesca (Gómez-Sala *et al.*, 2004, 2015; Muñoz-Atienza, 2009; Gómez-Sala, 2013).

El análisis de la producción de aminas biógenas mediante el ensayo en medio de cultivo sólido no permitió detectar las actividades HDC y ODC en ninguna de las cepas estudiadas; sin embargo, la actividad TDC se detectó en todas las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* (Fig. 9.5), excepto *E. faecium* CV1, BCS59 y MV5. Los resultados obtenidos en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis sólo difirieron en el caso de la cepa *E. faecium* SMA101, en la que se observó una reacción positiva sólo en anaerobiosis.

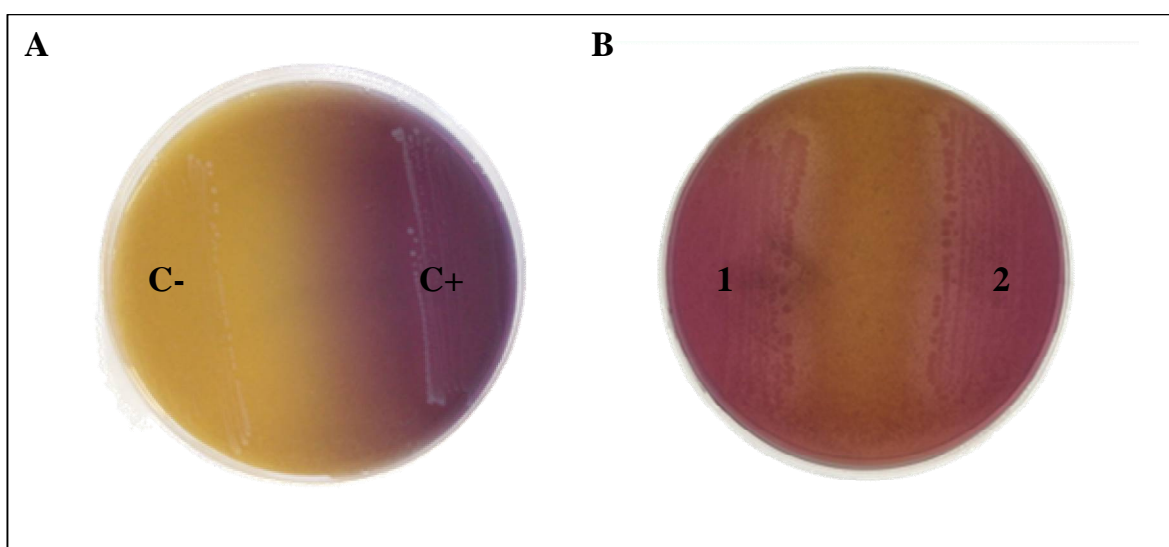


Figura 9.5. Evaluación fenotípica de la producción de tiramina por bacterias lácticas de origen acuático mediante un ensayo en placa. (A) C+: control positivo de producción de tiramina (*Lb. brevis* CECT4121); C-: control negativo de producción de tiramina (*Lactobacillus* sp. ATCC33222). (B) *E. faecium* CV2 (1) y *E. faecium* TPP2 (2). Fuente: Imágenes del autor.

En lo que se refiere a la determinación de la producción de aminas biógenas en los sobrenadantes de los cultivos de las bacterias lácticas por TLC, se observó que ninguna cepa produjo histamina ni putrescina (Fig. 9.6). Por el contrario, la tiramina se detectó en los sobrenadantes de todas cepas enterococales, excepto *E. faecium* BCS59 y MV5. Por último, empleando la técnica de PCR no se detectó la presencia de los genes *hdc* y *odc* en ninguna de las cepas evaluadas, mientras que el gen *tdc* se detectó en las 34 cepas enterococales, incluyendo *E. faecium* BCS59 y MV5 (ambas TDC-). A pesar de que la capacidad de los microorganismos para descarboxilar los aminoácidos depende de la especie, cepa y medio de cultivo en el que se desarrollen (Marcobal *et al.*, 2006b; Fernández *et al.*, 2007; Mazzoli *et al.*, 2009), la producción de tiramina podría ser una característica ampliamente distribuida entre los enterococos (Fernández *et al.*, 2007; Bonetta *et al.*, 2008; Torriani *et al.*, 2008; Latorre-Moratalla *et al.*, 2010). La ausencia de detección de producción de tiramina por *E. faecium* CV1 (*tdc*⁺, TDC⁺ por TLC) en el ensayo en placa puede ser debida a que la concentración de tiramina fuese

inferior al límite de detección de esta técnica, estimado en 350 mg/l (Bover-Cid y Holzapfel, 1999). Teniendo en cuenta estos falsos negativos y la discrepancia entre la presencia del gen descarboxilasa y la producción real de aminas biógenas, como en el caso de *E. faecium* BCS59 y MV5, se consideró la técnica de TLC como la más fiable para determinar la producción de aminas biógenas. En este sentido, esta técnica es más sencilla y sensible que la determinación en placa porque detecta niveles de hasta 1 mg/l de histamina y 10 mg/l de tiramina y putrescina y, además, es un método económico que no requiere equipamientos costosos ni personal especializado (García-Moruno *et al.*, 2005). Sin embargo, la técnica de PCR es una técnica útil que se puede emplear como prueba preliminar para la detección de cepas potencialmente productoras de aminas biógenas, si bien los resultados deben ser confirmados por TLC. Además, se ha descrito el empleo de PCR múltiplex que permite la detección simultánea de varios genes de descarboxilación de aminoácidos en una única reacción (Coton y Coton, 2005; Marcobal *et al.*, 2005).

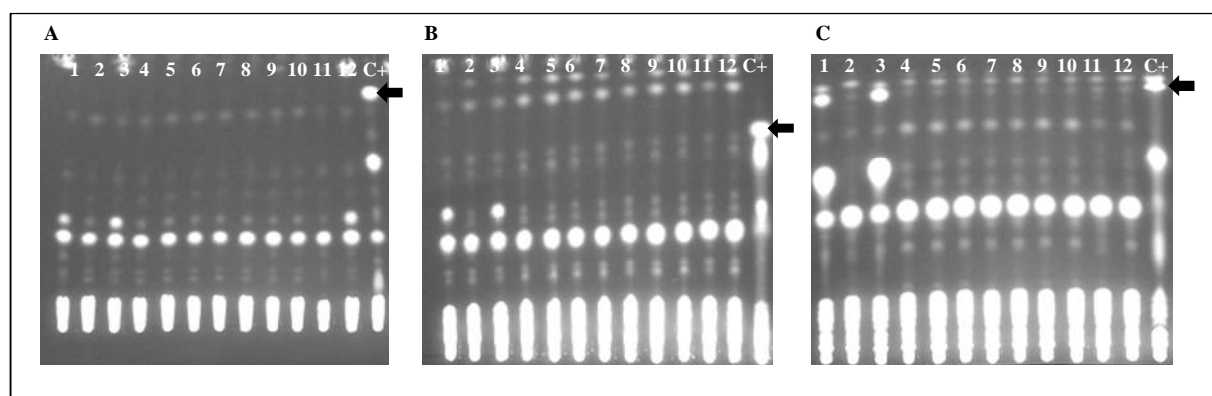


Figura 9.6. Evaluación fenotípica de la producción de histamina (A), putrescina (B) y tiramina (C) por bacterias lácticas de origen acuático mediante TLC. Detección de las correspondientes aminas biógenas en los sobrenadantes de los cultivos de *E. faecium* TPP2 (1), *P. pentosaceus* TPP3 (2), *E. faecium* TPM76 (3), *P. pentosaceus* LPV46 (4), *P. pentosaceus* LPM83 (5), *P. pentosaceus* B41 (6), *E. faecium* MV5 (7), *W. cibaria* P50 (8), *Lb. sakei* subesp. *carneus* SMA17 (9), *Lc. mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69 (10), *L. lactis* subesp. *cremoris* SMF110 (11) y *W. cibaria* P71 (12). C+: control positivo de producción de histamina y putrescina (*Lactobacillus* sp. ATCC33222) y de tiramina (*Lb. brevis* CECT4121). Las flechas indican la posición de migración correspondiente a cada amina biógena. Fuente: Imágenes del autor.

IX.2.3.2. Secuenciación nucleotídica y análisis funcional del gen *tdc* en *E. faecium* BCS59 y MV5

El alineamiento de la secuencia nucleotídica de 5.335 pb (Fig. 1; Capítulo IV) de los productos de PCR obtenidos del ADN de *E. faecium* BCS59 y MV5, que no produjeron tiramina por TLC ni en el ensayo en placa pero que amplificaron el gen *tdc* por PCR, mostró que los genes *tdc* eran idénticos en ambas cepas. El análisis del marco de lectura abierto (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) y de las secuencias nucleotídicas empleando el programa informático BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) reveló que este gen codifica una proteína de 625 aminoácidos idéntica a TDC de *E. faecium* Aus0085 (número de acceso AGS74298). Además, esta proteína es similar (99% de homología) a la descarboxilasa piridoxal-dependiente de *E. faecium* DO (número de acceso EAN10847) y a la fenilalanina y tirosina descarboxilasa de *E. faecium* RM58 (número de acceso

AJ783966). Conviene destacar que comparando la secuencia aminoacídica de la proteína de esta última cepa con la de TDC de *E. faecium* BCS59 y MV5 se observó que estas contenían una variación aminoacídica en la posición 186 (sustitución de alanina por treonina). Dado que la funcionalidad de TDC de *E. faecium* RM58 fue previamente demostrada (Marcobal *et al.*, 2006a), esta enzima se utilizó como molde para estudiar el significado funcional de la sustitución encontrada en nuestro estudio. Para ello, la sustitución de una alanina por una treonina (Ala-186-Thr) se introdujo en el plásmido pAM3 que portaba el gen *tdc* de *E. faecium* RM58 clonado en el vector pIN-III-A3 bajo el control de los promotores *lpp*^P-5 y *lac*^P (Marcobal *et al.*, 2006a), empleando la técnica de mutagénesis dirigida. El producto de PCR se digirió con la enzima *DpnI* y se transformó en *E. coli* DH5α. El análisis por TLC de la cepa recombinante *E. coli* DH5α (pAM3_{A-T}), que expresa esta variante del gen *tdc*, mostró que al igual que el control *E. coli* DH5α (pAM3), era capaz de producir tiramina (no se muestran los resultados), sugiriendo que esta sustitución de aminoácidos no era la responsable de la ausencia de producción de tiramina, lo que puede ser debido a que la sustitución está presente en una posición que no pertenece a ningún dominio conservado esencial para la funcionalidad biológica de la enzima (Marchler-Bauer *et al.*, 2009).

El operón que codifica la descarboxilasa de la tirosina se ha descrito en varias bacterias lácticas (Connil *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2003; Coton *et al.*, 2004; Wolken *et al.*, 2006; Coton y Coton, 2009). El análisis de la secuencia nucleotídica de 5.335 pb de *E. faecium* BCS59 y MV5 que contiene el gen *tdc* mostró que esta región también codifica: (i) una secuencia de 375 aminoácidos de la región C-terminal de la proteína idéntica a la tirosil-ARN_t sintetasa (codificada por *tyrS*) de *E. faecium* DO (número de acceso ZP_00602895)¹ y (ii) otra secuencia de 279 aminoácidos de la región N-terminal de la proteína que tiene una alta homología (99%) con una permeasa de aminoácidos (codificada por *tyrP*) de *E. faecium* (números de acceso ZP_05921494 y ZP_00602893²). La comparación de la secuencia nucleotídica de *E. faecium* BCS59 y MV5 con la de *E. faecium* DO mostró que sus regiones intergénicas *tyrS-tdc*, que consistían en 1.199 y 290 pb, respectivamente, eran diferentes. En este sentido, un fragmento de 137 pb, localizado entre las posiciones 124 y 266 de la región intergénica *tyrS-tdc* de *E. faecium* DO, estaba reemplazado en *E. faecium* BCS59 y MV5 por una secuencia de 1.046 pb. El análisis de esta secuencia reveló que contiene un *orf*, que se ha denominado *int* ya que codifica una supuesta proteína de 319 aminoácidos que presenta una alta homología (99%) con una integrasa de *E. faecium* DO (número de acceso ZP_00603339.1)³. Además, la secuencia está flanqueada por la secuencia repetida CATTTGT, localizada en las posiciones 117–123 (repetición directa izquierda; LDR, del inglés *Left Direct Repeat*) y 1.080–1.086 (repetición directa derecha; RDR, del inglés *Right Direct Repeat*) de la secuencia de 1.199 pb. Estos resultados sugieren que esta región

¹Este número de acceso ha sido sustituido por AFK58035.1 y la proteína correspondiente se ha identificado como tirosina-ARN_t ligasa.

²Este número de acceso ha sido sustituido por AFK58037.1 y la proteína correspondiente se ha identificado como transportador de aminoácidos de la familia de aminoácidos, poliaminas y organocaciones (APC, del inglés *Amino acid-Polyamine-Organocation*).

³Este número de acceso ha sido sustituido por AFK60346.1 y la proteína correspondiente se ha identificado como transposasa.

constituye una secuencia de inserción (SI). Es interesante mencionar que Coton y Coton (2009) describieron una secuencia de tamaño similar localizada en la región nucleotídica que precede a *tyrS* en *Lb. brevis* NS77 y flanqueada por la secuencia repetida GTTTGG. Esta secuencia codifica una supuesta proteína de 230 aminoácidos que muestra identidad con las proteínas de la familia de las transposasas SI30. Basándose en este hecho y en el contenido en G+C (45,31%) de la SI, estos autores sugirieron que *tdc* en *Lb. brevis* estaba localizado en una isla genómica, lo que podría explicar el hecho de que la producción de tiramina fuera una característica específica de cepa en esta especie. Sin embargo, esto no parece ser el caso de la SI encontrada en nuestro trabajo ya que su contenido en G+C (39,1%) es similar al de *E. faecium* DO (37,9%) y la integrasa de 319 aminoácidos sólo tiene un 17% de homología con la transposasa de 230 aminoácidos de *Lb. brevis* NS77. De acuerdo con estudios previos que han descrito la presencia de sitios de inicio de la transcripción localizados en la región nucleotídica que precede a *tdc* en el operón de la tiramina de *Lb. brevis* (Lucas *et al.*, 2003) y *E. faecalis* (Connil *et al.*, 2002), las predicciones informáticas también sugieren la existencia de un promotor de *tdc* en *E. faecium* DO (Fig. 1; Capítulo IV). Sin embargo, esta región no está presente en *E. faecium* BCS59 y MV5 debido a una supuesta SI que no proporciona un promotor alternativo. Este hecho podría explicar la ausencia de actividad TDC en estas cepas *tdc*⁺/TDC⁻ y podría también relacionarse con la característica producción de tiramina dependiente de cepa observada en otros estudios para el género *Enterococcus* (Ladero *et al.*, 2009). Conviene destacar que a pesar de que la ausencia de producción de aminas biógenas en las 40 bacterias lácticas no enterococales y en dos enterococos sea una característica deseable para su empleo como probióticos, la estabilidad del fenotipo TDC⁻ en *E. faecium* BCS59 y MV5 constituye un aspecto de gran relevancia que deberá estudiarse en profundidad.

Como conclusión general de la evaluación de la seguridad *in vitro* realizada en este trabajo conviene destacar que, según nuestros conocimientos, este es el primer estudio a gran escala que emplea una aproximación más exhaustiva que la establecida por la EFSA para las bacterias lácticas con el estatus QPS. Asimismo, la resistencia a antibióticos y/o los factores de virulencia se detectaron en todas las cepas de *E. faecalis*, en *E. faecium* (79%) y, en menor medida, en las cepas no enterococales (37,5%). Esta es la primera descripción del gen que confiere resistencia a eritromicina (*mef*[A/E]) en los géneros *Pediococcus* y *Weissella*, así como del gen de resistencia a lincosamidas (*lnu*[A]) en el género *Pediococcus*. El análisis *in vitro* presentado en este trabajo, que permitió seleccionar 33 cepas seguras (8 *E. faecium*, 11 *P. pentosaceus*, 1 *Lb. carnosus*, 1 *Lb. curvatus*, 3 *L. cremoris*, 3 *Lc. cremoris* y 6 *W. cibaria*) de las 99 bacterias lácticas de origen acuático evaluadas, constituye una estrategia válida como método de preselección a gran escala de bacterias lácticas seguras para su empleo como probióticos en acuicultura que permitiría evitar la dispersión de cultivos microbianos con características perjudiciales para el medio ambiente acuático. No obstante, es necesario llevar a cabo también una evaluación *in vivo* en la que se estudie la ausencia de toxicidad y efectos indeseables

empleando cultivos celulares, alimento vivo y, por último, peces antes de que estas bacterias lácticas puedan ser consideradas como probióticos seguros para el desarrollo de una acuicultura sostenible.

IX.3. TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *E. faecium* DE ORIGEN ALIMENTARIO MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE (PFGE) Y DIVERSAS TÉCNICAS BASADAS EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La tipificación molecular de cepas de *E. faecium* ha permitido la identificación de clones hospitalarios, aunque también se ha empleado por otros autores para identificar y diferenciar cepas probióticas (Vankerckhoven *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2010). Asimismo, las técnicas de tipificación se han utilizado en estudios epidemiológicos con el objetivo de identificar el origen de los microorganismos responsables de brotes infecciosos, conocer el modo de propagación, reservorios y vectores de microorganismos patógenos y, por último, evaluar medidas específicas de control y tratamiento para las enfermedades infecciosas (Singh *et al.*, 2006). Además, estas técnicas también se han empleado para confirmar la capacidad de implantación, prevalencia y supervivencia de cultivos iniciadores en alimentos fermentados (Rubio *et al.*, 2013).

En este trabajo se determinó la relación genética de 14 cepas de *E. faecium* de origen alimentario, incluyendo ocho cepas de origen acuático seleccionadas previamente por su actividad antimicrobiana directa frente a ictiopatógenos Gram-positivos y Gram-negativos y su seguridad *in vitro* (Capítulo III; secciones IX.1 y IX.2), mediante la técnica PFGE y diversas técnicas moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR: (i) amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD); (ii) amplificación por PCR de secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (ERIC-PCR), y (iii) análisis de los patrones de restricción del ADN ribosómico amplificado por PCR (ARDRA). La técnica PFGE se ha utilizado como método estándar de referencia para tipificar cepas de *E. faecium* en estudios epidemiológicos (Vankerckhoven *et al.*, 2004; Klare *et al.*, 2005a; Werner *et al.*, 2011), pero también se ha empleado en estudios sobre la diversidad genética de cepas de *E. faecium* en alimentos (Jurkovič *et al.*, 2007) y sobre la relación genética entre aislados clínicos y cultivos probióticos (Vankerckhoven *et al.*, 2008; Noguchi *et al.*, 2011). No obstante, actualmente existen varias técnicas alternativas a la de PFGE que se han utilizado exitosamente para la tipificación de enterococos a nivel de cepa, reduciendo así el tiempo y el coste económico y requiriendo sólo equipos comunes (Werner *et al.*, 2003). En este trabajo, el análisis de los patrones obtenidos mediante PFGE (Fig. 1; Capítulo V) empleando la enzima *Sma*I permitió identificar cuatro subgrupos, a diferencia del análisis con las técnicas RAPD (Fig. 2; Capítulo V) y ERIC-PCR (Fig. 3; Capítulo V) que revelaron nueve y ocho subgrupos, respectivamente. Con respecto al índice de diversidad, nuestros resultados mostraron que ERIC-PCR permitió obtener el valor más alto (1,0), seguido de RAPD (0,934) y PFGE

(0,824), mientras que por ARDRA se observó el valor más bajo (0,604). El hecho de que la técnica ERIC-PCR sea la que presentó un mayor poder de discriminación en nuestro trabajo está en concordancia con los resultados obtenidos por Jurkovič *et al.* (2007), quienes mostraron que esta técnica era más adecuada que la de PFGE para la tipificación de enterococos en quesos. Martín-Platero *et al.* (2009) también observaron que las técnicas ERIC-PCR y RAPD eran útiles para identificar y genotipar enterococos aislados de queso. Además, Weiss *et al.* (2010) observaron que la técnica RAPD mostraba un mayor poder de discriminación de *E. faecium* de piensos animales que otras técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR. Ventura y Zink (2002) también observaron que las técnicas ERIC-PCR y rep-PCR eran herramientas útiles para diferenciar y monitorizar cepas de *Lb. johnsonii* aisladas de distintos orígenes. Asimismo, Markiewicz *et al.* (2010) mostraron que las técnicas RAPD y rep-PCR presentaban mayor poder de discriminación que la técnica PFGE para la tipificación de *Lactobacillus* spp. de distintos orígenes. El bajo índice de diversidad obtenido con la técnica ARDRA en nuestras cepas enterococales está en concordancia con estudios previos que mostraron la utilidad de esta técnica para identificar bacterias a nivel de especie pero no para tipificar cepas de la misma especie (Michel *et al.*, 2007; Markiewicz *et al.*, 2010; Weiss *et al.*, 2010).

En este trabajo, el análisis de las bandas obtenidas reveló una alta heterogeneidad genética en los enterococos evaluados, probablemente debido a su distinto origen, aunque también se observó una relación filogenética entre algunas cepas. A este respecto, los patrones de *E. faecium* L50, BNM58, SMF8 y SMA8 obtenidos empleando las técnicas PFGE y ARDRA mostraron un 100% de similitud; sin embargo, los obtenidos con las técnicas RAPD y ERIC-PCR mostraron una menor relación entre estas cepas (67 y 73% de similitud, respectivamente). Por otra parte, los patrones de *E. faecium* LPP29, TPM76, CV2 y CV1 revelaron una similitud del 100% cuando se analizaron mediante las técnicas PFGE, RAPD y ARDRA, mientras que estas cepas mostraron poca relación por ERIC-PCR (55% de similitud), con excepción de *E. faecium* CV1 y CV2, que presentaron una similitud del 75%. En conclusión, los resultados de este trabajo indican la idoneidad de la técnica ERIC-PCR para el genotipado de *E. faecium* y, muy probablemente, para su monitorización específica cuando estas cepas se empleen como probióticos en producción animal.

IX.4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO PARA LA PROTECCIÓN DE *Artemia franciscana* FRENTE A *Vibrio campbellii* MEDIANTE ENSAYOS DE EXPOSICIÓN DE CULTIVOS GNOTOBIÓTICOS (AXÉNICOS)

La principal dificultad para la producción intensiva de larvas y juveniles de peces es su elevada mortalidad, que en muchos casos, puede superar el 99%, debida a bacterias patógenas y oportunistas presentes en el agua de cultivo, lo que resulta favorecido por la inmadurez del sistema inmunitario y

digestivo de larvas y juveniles. Por ello, el control exhaustivo de la calidad microbiológica del agua de cultivo constituye un aspecto de especial relevancia para asegurar una correcta producción intensiva de larvas y juveniles (Verschuere *et al.*, 2000b; Hjelm *et al.*, 2004; Vine *et al.*, 2006). En consecuencia, actualmente se considera que el empleo de microorganismos como probióticos y biocontroladores en la acuicultura debería realizarse principalmente durante las fases larvaria y de alevinaje de las especies acuícolas. A este respecto podrían adicionarse directamente a los sistemas cerrados (fase de alevinaje) o semicerrados (fase desarrollo y engorde) de recircularización de agua empleados en las modernas piscifactorías o bien al agua de cultivo del alimento vivo, lo que favorecería su ingestión por las especies acuícolas a las que se suministre dicho alimento vivo “enriquecido” con la(s) especie(s) microbiana(s) de interés (Vine *et al.*, 2006).

Los sistemas intensivos que se emplean en acuicultura marina para producir grandes cantidades de larvas de peces y mariscos y alimento vivo (rotíferos y artemias) han favorecido el desarrollo de enfermedades de origen bacteriano que provocan altas mortalidades y como consecuencia grandes pérdidas económicas en este sector (Sorgeloos *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2006a). A este respecto, se ha observado que el crustáceo *Artemia* spp., principal presa viva utilizada en la dieta de larvas de muchas especies acuícolas (Lavens y Sorgeloos, 2000), puede transferir bacterias a las larvas durante esta etapa (Verschuere *et al.*, 1997; Olafsen, 2001; Vaseeharan y Ramasamy, 2003). La vibriosis, originada por varias especies del género *Vibrio*, es una de las enfermedades más importantes durante el cultivo de especies acuícolas, incluyendo peces, crustáceos y moluscos (Gómez-Gil *et al.*, 2004). Las especies que se han asociado a la vibriosis son *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Listonella anguillarum* (anteriormente, *Vibrio anguillarum*), *Vibrio vulnificus* y *Vibrio splendidus* (Aguirre y Collins, 1993; Saulnier *et al.*, 2000; Chatterjee *et al.*, 2005; Defoirdt *et al.*, 2007b). En este contexto, *V. campbellii* está ampliamente distribuido en ambientes marinos y se considera uno de los agentes causales de la vibriosis luminiscente en gambas y cangrejos (Hameed *et al.*, 1996; Gómez-Gil *et al.*, 2004; Defoirdt *et al.*, 2007b; Phuoc *et al.*, 2008; Thibodeaux *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). Asimismo, la patogenicidad de *V. campbellii* se ha demostrado empleando ensayos *in vivo* en *A. franciscana* (Soto-Rodríguez *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2005; Defoirdt *et al.*, 2006, 2008), *Litopenaeus vannamei* (Soto-Rodríguez *et al.*, 2006) y *Callinectes sapidus* (Thibodeaux *et al.*, 2009).

De acuerdo con lo expuesto, se ha propuesto el uso de probióticos para mantener un ambiente acuático saludable en los tanques de cultivo y controlar la aparición de enfermedades de origen bacteriano en larvicultura (Marques *et al.*, 2006c). A este respecto, se han empleado animales acuáticos gnotobióticos (axénicos) para estudiar el modo de acción de los probióticos que se pretenden emplear en larvicultura. Uno de los principales animales acuáticos utilizados para estudiar la interacción entre probióticos y hospedador es *A. franciscana* porque se puede utilizar fácilmente en condiciones

gnotobióticas debido a su tamaño y puede emplearse como vector de los probióticos en larvas de peces, crustáceos o moluscos (Marques *et al.*, 2006a).

IX.4.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN MEDIO SÓLIDO Y EN COCULTIVOS FRENTE A *V. campbellii*

La actividad antimicrobiana de 33 bacterias lácticas aisladas de pescado, marisco y productos de la pesca y seleccionadas previamente por su actividad antimicrobiana directa frente a ictiopatógenos Gram-positivos y Gram-negativos y su seguridad *in vitro* (Capítulo III) se evaluó frente a *V. campbellii* (Capítulo VI), considerado como el principal ictiopatógeno que afecta a *Artemia* spp. (Defoirdt *et al.*, 2007a). Empleando el medio de cultivo TSA (del inglés *Tryptone Soya Agar*) suplementado con glucosa (TSA-G; 0,25 y 0,60%, p/v), la mayoría de estas bacterias lácticas (72,7 y 93,9%, respectivamente) presentaron actividad antimicrobiana frente a *V. campbellii* LMG21363. Asimismo, se detectó actividad antimicrobiana en sus sobrenadantes después del tratamiento con proteinasa K y tratamiento térmico, pero ésta desapareció al ajustar los sobrenadantes a pH 6,2. Estos resultados sugieren que la inhibición de este patógeno puede deberse a la producción de ácidos orgánicos por las bacterias lácticas. La producción de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas activas frente a microorganismos patógenos es una propiedad deseable para las bacterias lácticas que se pretenden emplear como probióticos en acuicultura (Ringø y Gatesoupe, 1998; Gatesoupe, 2008). A este respecto, varias bacterias lácticas han mostrado actividad antimicrobiana frente a ictiopatógenos (Balcázar *et al.*, 2008; Ringø *et al.*, 2010a; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011a); sin embargo, según nuestros conocimientos, ningún trabajo previo había descrito la inhibición de *V. campbellii* por bacterias lácticas. Además, en nuestro trabajo se detectó la inhibición de *V. campbellii* LMG21363 después de 24 h de cocultivo con 26 bacterias lácticas (78,8%; Tabla 2; Capítulo VI) que pertenecen a todas las especies evaluadas excepto *W. cibaria*. Considerando que no se pudo establecer ninguna asociación entre la inhibición de *V. campbellii* LMG21363 y los valores de pH de los cocultivos, es probable que la inhibición de su crecimiento fuera debida a la competencia por los nutrientes y/o la producción de ácidos orgánicos u otras sustancias antimicrobianas. En este contexto, los ácidos orgánicos en su forma no disociada poseen la capacidad de traspasar la membrana de los microorganismos para disociarse y acidificar su interior, promoviendo la expulsión de H⁺ desde la célula y originando el desacoplamiento de la bomba Na⁺/K⁺ (ATPasa) (Gonçalves *et al.*, 1997). A este respecto, Vázquez *et al.* (2005) describieron que los ácidos láctico y acético producidos por nueve bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* fueron responsables de la inhibición de varios vibrios patógenos (*V. alginolyticus*, *V. pelagius* y *V. splendidus*) que afectan al cultivo de rodaballo. De forma similar, Tejero-Sariñena *et al.* (2012) observaron que la

capacidad de algunas especies del género *Lactobacillus* para inhibir a diversos patógenos (*E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* y *Cl. difficile*) se debía a la producción de ácidos orgánicos.

IX.4.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS PARA SOBREVIVIR EN EL MEDIO ACUÁTICO MARINO Y DE SU EFICACIA PARA LA PROTECCIÓN DE *A. franciscana* FRENTE A *V. campbellii* EMPLEANDO ENSAYOS DE EXPOSICIÓN DE CULTIVOS GNOTOBIÓTICOS (AXÉNICOS)

La supervivencia de las bacterias lácticas en medio acuático marino es una propiedad deseable para su empleo como probióticos en especies acuáticas marinas (Vázquez *et al.*, 2003). A este respecto, en este trabajo se observó que todas las bacterias lácticas sobrevivieron en el medio acuático marino a 28 °C durante 48 h (Tabla 2; Capítulo VI).

El efecto antagonista *in vivo* de cepas probióticas frente a ictiopatógenos se ha estudiado mediante el empleo de modelos animales como *A. franciscana* (Verschuere *et al.*, 2000a; Marques *et al.*, 2006b). En este trabajo se evaluó el efecto de 23 bacterias lácticas en la protección de *A. franciscana* frente a *V. campbellii* (1×10^7 ufc/ml) empleando cuatro tipos de ensayos de exposición de cultivos gnotobióticos (Fig. 9.7). La supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* tratados con bacterias lácticas inactivadas (1×10^7 ufc/ml) se comparó con la de los nauplios expuestos a sus respectivas formas viables (1×10^7 ufc/ml) con el objetivo de separar el posible efecto atribuido exclusivamente a las bacterias viables (*e.g.*, prevención de la proliferación de microorganismos patógenos por la competición de nutrientes, espacio y/o sitios de adhesión en el tracto intestinal o sobre la superficie de artemia o por la producción de sustancias antimicrobianas; aporte de enzimas bacterianas activas que mejoren la digestión, y/o mejora de la calidad del agua) (Marques *et al.*, 2005) de aquellos compartidos por las bacterias inactivadas y viables (*e.g.*, mejora del estatus nutricional de artemia y estimulación de su respuesta inmune). Los resultados mostraron que sólo los tratamientos con *E. faecium* CV1 inactivada y viable y *L. lactis* subesp. *cremoris* SMF161 inactivada protegieron *A. franciscana* frente a *V. campbellii* LMG21363 en agua de mar filtrada y autoclavada (experimento 1) (Tabla 3; Capítulo VI). Estos resultados sugieren que estas bacterias lácticas podrían mejorar el estatus nutricional de artemia, ayudando de esta forma a prevenir los efectos perjudiciales de este patógeno (Marques *et al.*, 2006b) y/o que alguna(s) molécula(s), como los patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP, del inglés *Microbe Associated Molecular Patterns*), podrían estimular la respuesta inmune innata de artemia y así mejorar su supervivencia frente a este ictiopatógeno. En este contexto, Baruah *et al.* (2010) demostraron que *A. franciscana* alimentada con *E. coli* productora de la proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp 70, del inglés *Heat Shock Protein*) homóloga y heteróloga (de artemia) (1×10^7 ufc/ml) mejoraba la supervivencia frente a *V. campbellii* (1×10^7 ufc/ml) debido

probablemente a una activación de la respuesta inmune, como sugiere el aumento de la actividad fenoloxidasa, considerada como uno de los mecanismos de defensa más importantes en este crustáceo.

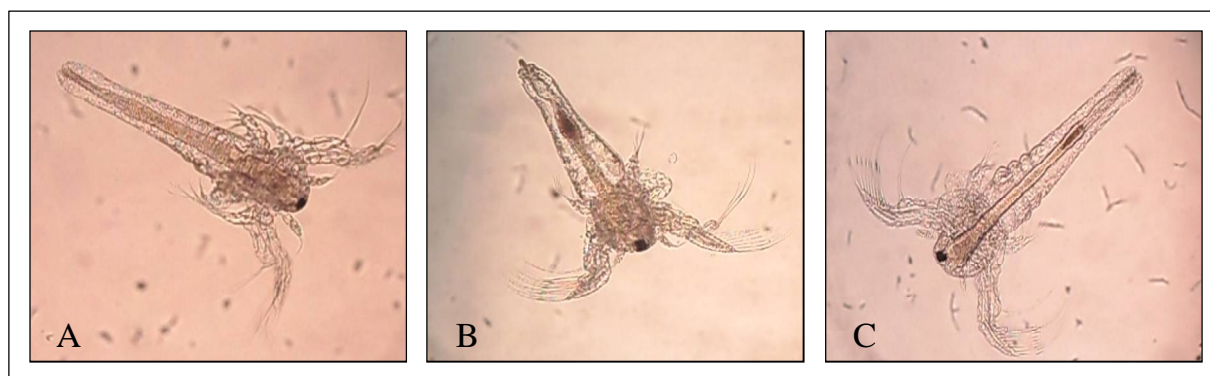


Figura 9.7. Imágenes de microscopía óptica de nauplios de *A. franciscana*. (A) Nauplio de *A. franciscana* sin tratar y sin contenido intestinal (control); (B) nauplio de *A. franciscana* 36 h después de la infección con *V. campbellii* y con contenido intestinal, y (C) nauplio de *A. franciscana* 36 h después de la exposición con bacterias lácticas y *V. campbellii* y con contenido intestinal. Fuente: Imágenes del autor.

Por otra parte, se ha observado que el cultivo de artemia en condiciones de inanición o con alimentación de baja calidad genera animales débiles y vulnerables a las enfermedades causadas por microorganismos patógenos y oportunistas (Marques *et al.*, 2006b). A este respecto, Marques *et al.* (2006b) observaron que la supervivencia de *A. franciscana* en presencia de *Bacillus* sp. LVS2 y *Aeromonas hydrophila* LVS3 (5×10^6 ufc/ml) aumentaba sólo cuando los nauplios infectados con *V. campbellii* LMG21363 (5×10^6 ufc/ml) eran alimentados con estas bacterias y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de calidad media (mutante isogénico mnn9 con alta concentración de quitina y glucanos en la pared celular y desarrollado en el medio de cultivo YEPD [del inglés *Yeast Extract Peptone Dextrose*]) o de calidad alta (mutante isogénico mnn9 desarrollado en el medio de cultivo YNB [del inglés *Yeast Nitrogen Based*]); sin embargo, en ausencia de este mutante isogénico o en presencia de la cepa salvaje, la supervivencia de artemia no mejoró. Además, la adición diaria de levadura de calidad media y alta al cultivo de artemia (sin suplementar con bacterias) también mejoró su supervivencia frente a *V. campbellii* (Marques *et al.*, 2006b). Asimismo, Patra y Mohamed (2003) mostraron que la levadura *Saccharomyces boulardii* (1×10^4 ufc/ml) tenía un efecto protector para los nauplios de artemia frente a *V. harveyi* ($6,1 \times 10^6$ ufc/ml). De forma similar, Lamari *et al.* (2014) observaron una mayor protección de artemia frente al patógeno *V. alginolyticus* ATCC17749 (10^6 – 10^7 ufc/ml) cuando se alimentaban con *Lb. casei* BR51, *Lb. casei* X2, *Lb. dextrinicus* BR743, *Lb. plantarum* 611, *Lb. plantarum* B3G o *Lc. mesenteroides* B31 (10^6 – 10^7 ufc/ml) y un producto comercial enriquecido con nutrientes; sin embargo, el efecto del producto comercial solo sobre la supervivencia de *A. franciscana* en presencia del patógeno no se evaluó. Por otra parte, Verschuere *et al.* (2000a) describieron que varias cepas de la familia Vibrionaceae y los géneros *Moraxella* y *Kurthia* (5×10^6 ufc/ml) ejercían una protección total frente a *V. proteolyticus* CW8T2 (10^2 – 10^3 ufc/ml) en artemias alimentadas con pienso irradiado. Así pues, es probable que en nuestro trabajo no se pudiera observar

un efecto protector de artemia frente a *V. campbellii* en un mayor número de las bacterias lácticas evaluadas debido a que no se suministró ninguna alimentación adicional a los cultivos.

Con el objetivo de suministrar algún sustrato para que las bacterias lácticas produjeran compuestos antimicrobianos frente a *V. campbellii*, en este trabajo se realizaron ensayos de exposición de cultivos gnotobióticos similares a los citados anteriormente pero en agua de mar filtrada y autoclavada suplementada con glucosa (experimento 2). En estos ensayos, la mortalidad de artemia aumentó, siendo el efecto dosis-dependiente debido a la ausencia de oxígeno originada por el metabolismo oxidativo de la glucosa por *V. campbellii* (Tabla 4; Capítulo VI). En el tercer tipo de ensayo de exposición de cultivos gnotobióticos se determinó que las bacterias lácticas no mostraban ningún efecto perjudicial para artemia cuando se añadían en agua marina filtrada y autoclavada suplementada con caldo MRS (experimento 3) (Tabla 5; Capítulo VI). A este respecto, varios estudios han descrito el mismo efecto en la supervivencia de *A. franciscana* en presencia de bacterias, levaduras o algas y ausencia de patógenos (Verschuere *et al.*, 1999; Orozco-Medina *et al.*, 2002; Marques *et al.*, 2005). Además, la cepa inactivada *L. cremoris* SMF161 mostró un efecto positivo en la supervivencia de artemia (Tabla 5; Capítulo VI) cuando los nauplios se cultivaron en presencia de MRS y se infectaron con *V. campbellii*, lo que apoya la hipótesis de que la biomasa de las bacterias lácticas muertas sirve como un complemento nutricional para *A. franciscana* y/o que alguna(s) molécula(s) podría(n) estimular la respuesta inmune innata y así mejorar la supervivencia de artemia.

Por otra parte, en este trabajo se evaluó el efecto de diversas combinaciones de bacterias lácticas para proteger *A. franciscana* en agua de mar filtrada y autoclavada (experimento 4). Sólo el grupo 2 (*E. faecium* CV1, *L. cremoris* SMF161, *L. cremoris* SMF110 y *P. pentosaceus* B260) (Tabla 6; Capítulo VI) mejoró la supervivencia de artemia empleando las formas inactivadas y viables de las bacterias, sugiriendo de nuevo que las bacterias podrían mejorar el estatus nutricional de artemia y/o que alguna(s) molécula(s) bacteriana(s) podría(n) estimular la respuesta inmune innata de este crustáceo y mejorar su supervivencia frente a este patógeno. En un estudio previo, se observó un efecto beneficioso de la adición de dos bacterias (*Microbacterium* sp. 8L y *Exiguobacterium* sp. 8N) de forma individual o en conjunto en la supervivencia de artemia sólo cuando se añadió un suplemento de levadura al cultivo de artemia (Orozco-Medina *et al.*, 2002). En resumen, parece que es más difícil demostrar un efecto beneficioso en la supervivencia de *A. franciscana* con cepas bacterianas añadidas al cultivo de artemia de forma independiente o incluso en conjunto que cuando se suplementa con levadura.

Hasta la fecha, nuestro trabajo es el primero que describe bacterias lácticas con actividad antimicrobiana frente a *V. campbellii* en medio sólido y en cocultivos. Asimismo, en ningún estudio previo se había evaluado el efecto de la adición de glucosa o caldo MRS en un cultivo de artemia para determinar el efecto de bacterias lácticas en la supervivencia de este crustáceo en presencia y ausencia de este patógeno. Además, nuestros resultados sugieren que *E. faecium* CV1 y *L. cremoris* SMF161

podrían cubrir las necesidades nutricionales de *A. franciscana* y/o mejorar su respuesta inmune, ayudando de esta forma a proteger a artemia frente a *V. campbellii*. Sin embargo, es necesario realizar más estudios utilizando mejores condiciones nutricionales (*e.g.*, suplementación con levadura) en el cultivo de artemia para mejorar los efectos probióticos de las bacterias lácticas en relación a la protección de este crustáceo frente a este ictiopatógeno.

IX.5. EVALUACIÓN *in vitro* DE LOS EFECTOS DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO EN LEUCOCITOS DE RIÑÓN ANTERIOR DE RODABALLO (*Scophthalmus maximus* L.)

Entre los numerosos efectos beneficiosos de los probióticos, la estimulación de la respuesta inmune inespecífica es fundamental para el control de enfermedades infecciosas en sistemas de producción acuícola; sin embargo, los mecanismos por los que los probióticos modulan la respuesta inmune en peces todavía no se han elucidado completamente. Normalmente, los resultados obtenidos *in vitro* suelen predecir los que se obtendrán *in vivo* (Salinas *et al.*, 2005; Salinas *et al.*, 2006); no obstante, en algunas ocasiones, a pesar de que las características *in vitro* de una cepa sugieran su idoneidad como probiótico en peces, estos resultados no coinciden con los ensayos *in vivo* (Spanggaard *et al.*, 2001; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b). En este contexto, hay que tener en cuenta que algunos parámetros, como la vía y la frecuencia de administración, la dosis y la duración del tratamiento, pueden influir en las diferencias observadas. Por lo tanto, los ensayos *in vitro* son útiles para evaluar el efecto del contacto directo entre las bacterias lácticas y las células del sistema inmune y poder seleccionar la(s) cepa(s) más apropiada(s) antes de realizar ensayos *in vivo* que son más caros, requieren más tiempo para su desarrollo y precisan del sacrificio de un mayor número de peces para su realización. Así pues, en este trabajo se ha evaluado *in vitro* el efecto de ocho bacterias lácticas de origen acuático seleccionadas por su actividad antimicrobiana directa frente a ictiopatógenos Gram-positivos y Gram-negativos y su seguridad *in vitro* (*E. faecium* CV1, *E. faecium* LPP29, *Lb. curvatus* subesp. *curvatus* BCS35, *L. lactis* subesp. *cremoris* SMF110, *Lc. mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69, *P. pentosaceus* SMM73, *P. pentosaceus* TPP3 y *W. cibaria* P71) en la viabilidad y respuesta inmune innata de leucocitos de riñón anterior de rodaballo, determinándose la influencia de la viabilidad de las cepas en los parámetros inmunológicos evaluados (Capítulo VII).

IX.5.1. EVALUACIÓN *in vitro* DE LOS EFECTOS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LA VIABILIDAD DE LEUCOCITOS DE RIÑÓN ANTERIOR DE RODABALLO

Los probióticos deben estimular la respuesta inmune sin causar citotoxicidad en las células de la especie hospedadora a la que se van a administrar (Kim y Austin, 2006a). A este respecto, con el objetivo de evaluar el efecto de las bacterias lácticas en la viabilidad de los leucocitos (linfocitos y fagocitos) de rodaballo se utilizaron en este trabajo dos ensayos colorimétricos: MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) y LDH (lactato deshidrogenasa). Los resultados obtenidos en ambos ensayos mostraron que las bacterias lácticas inactivadas no afectaban a la viabilidad celular de los leucocitos de rodaballo (Fig. 1; Capítulo VII) y pusieron de manifiesto la utilidad de estos ensayos para el estudio del efecto de las bacterias lácticas inactivadas. Sin embargo, el metabolismo de las bacterias lácticas viables interfirió con las actividades enzimáticas determinadas en estos ensayos, haciendo que estos ensayos colorimétricos no sean recomendables para determinar el efecto de bacterias viables en la viabilidad de los leucocitos.

Con el objetivo de comparar el efecto entre bacterias lácticas inactivadas y viables en la viabilidad de los leucocitos se utilizó un ensayo de detección de anexina V/ioduro de propidio (IP) empleando citometría de flujo (Fig. 1 Suplementaria; Capítulo VII), lo que confirmó los resultados obtenidos en los ensayos colorimétricos realizados con las bacterias lácticas inactivadas (Tabla 1; Capítulo VII). Además, la citometría de flujo permitió distinguir el efecto en las subpoblaciones celulares de linfocitos y fagocitos, observándose que ninguna de las bacterias lácticas analizadas en su forma inactivada afectaba a la viabilidad de los leucocitos, excepto *Lc. cremoris* SMM69, que incrementaba la apoptosis de los fagocitos. Por el contrario, las bacterias lácticas viables mostraron cinco efectos distintos en la viabilidad de los leucocitos del riñón anterior de rodaballo: (i) *Lb. curvatus* BCS35, *P. pentosaceus* SMM73 y *P. pentosaceus* TPP3 no afectaron la apoptosis/necrosis de los linfocitos y fagocitos; (ii) *E. faecium* CV1 disminuyó la apoptosis de los linfocitos; (iii) *Lc. cremoris* SMM69 disminuyó la apoptosis de los linfocitos y aumentó la apoptosis tardía/necrosis en fagocitos; (iv) *E. faecium* LPP29 y *L. cremoris* SMF110 aumentaron la apoptosis tardía/necrosis de los fagocitos y linfocitos pero su efecto final sobre la viabilidad de los linfocitos fue positiva, y (v) *W. cibaria* P71 incrementó la apoptosis/necrosis en de los linfocitos y fagocitos. Estos resultados ponen de manifiesto que la evaluación del efecto de las bacterias lácticas en la viabilidad de las células del sistema inmune en combinación con la evaluación de su efecto inmunomodulador constituye un método apropiado para determinar, antes de llevar a cabo los ensayos *in vivo*, cómo las distintas cepas y su estado de viabilidad influyen en las células inmunes. A este respecto, el efecto de las bacterias lácticas evaluadas es específico de la cepa que se emplea. Asimismo, es posible que se obtengan diferentes efectos de estos probióticos sobre leucocitos de otras especies de peces teleósteos, como se ha descrito previamente en leucocitos aislados de dorada y lubina tratados con *Vagococcus fluvialis* (Román *et al.*, 2012).

Actualmente, están disponibles las secuencias de los genomas completos de muchas especies de peces pertenecientes a un gran número de familias. El análisis de estas secuencias ha mostrado la presencia de genes duplicados que pueden dar lugar a la subfuncionalización y, probablemente, esto favorece la diversidad de los mecanismos de defensa entre las especies de peces, lo que provocaría respuestas diferentes frente al mismo agente patógeno (Kassahn *et al.*, 2009).

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que interviene durante la patología de muchas enfermedades, incluyendo los desórdenes de la función inmune (Ekert y Vaux, 1997). Pocos estudios han mostrado el efecto directo de los probióticos en la apoptosis de células de peces (Salinas *et al.*, 2008b; Lazado y Caipang, 2014a) y, hasta la fecha, en ninguno de ellos se ha evaluado su efecto en células del sistema inmune de peces. En este contexto, se han descrito resultados distintos dependiendo de la cepa bacteriana, tipo de tejido o especie de pez evaluada. Salinas *et al.* (2008b) evaluaron el efecto de extractos citoplasmáticos de dos cepas (*Lb. delbrückii* subsp. *lactis* CECT287 y *Shewanella* sp. 51M6) en la proliferación y apoptosis de dos líneas celulares: SAF-1, derivada de fibroblastos de aleta dorsal de dorada, y EPC, derivada de células de epiteloma papiloso de carpa. Los extractos citoplasmáticos presentaron un efecto diferente, siendo sólo el obtenido de *Lb. lactis* CECT287 el que ejerció un efecto apoptótico y antiproliferativo en ambas líneas celulares. Otros estudios han mostrado un doble efecto de los probióticos en la apoptosis de varias líneas celulares (Lazado *et al.*, 2011; Lazado y Caipang, 2014a). Así, Lazado y Caipang (2014a) no observaron ningún cambio en la actividad de la enzima caspasa-3 en células epidérmicas primarias de bacalao Atlántico expuestas a *Pseudomonas* sp. GP21 y *Psychrobacter* sp. GP12, lo que indica que estas cepas no tienen efecto en la apoptosis. Sin embargo, estas cepas probióticas redujeron significativamente la apoptosis inducida por *V. anguillarum* 2133 en células epidérmicas primarias dorsales a las 24 h de incubación pero no en las células ventrales durante el mismo período de incubación, mostrando un posible doble efecto en la protección frente a la apoptosis inducida por este patógeno. Asimismo, en otro estudio, *Pseudomonas* sp. GP21 y *Psychrobacter* sp. GP12 indujeron la apoptosis de células epiteliales del recto de bacalao pero redujeron la apoptosis en células epiteliales aisladas del intestino anterior, medio y posterior en presencia de *V. anguillarum* 2133 (Lazado *et al.*, 2011). El estudio de cómo los probióticos modulan la apoptosis en células inmunes puede aportar información adicional sobre el mecanismo de homeostasis y tolerancia inmune a los microorganismos (Carol *et al.*, 2006) y ofrecer nuevas opciones para el tratamiento de enfermedades (Elmadfa *et al.*, 2010). Estudios previos en células mamarias han mostrado que los probióticos pueden permitir a las células sobrevivir a distintos factores de estrés estimulando la supervivencia celular (Thomas y Versalovic, 2010) y también inducir la apoptosis como medida terapéutica en enfermedades inflamatorias (Carol *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2010; Angulo *et al.*, 2011). Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar cómo la modulación de la apoptosis puede afectar a la salud de los peces.

IX.5.2. EVALUACIÓN *in vitro* DE LOS EFECTOS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LA ESTIMULACIÓN DE PARÁMETROS DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA DE LEUCOCITOS DE RIÑÓN ANTERIOR DE RODABALLO

Los probióticos pueden interactuar con los componentes celulares y humorales del sistema inmune para mejorar la respuesta inmune innata y específica (Nayak, 2010). Las bacterias lácticas, como otras bacterias Gram-positivas, expresan MAMP que son reconocidos por receptores de células inmunes y epiteliales, conocidos como receptores de reconocimiento de patrón (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptors*) (van Baarlen *et al.*, 2013). La interacción entre las bacterias y las células del hospedador conduce a la activación de la respuesta inmune, incluyendo la activación del estallido respiratorio y la fagocitosis, que desempeñan un papel importante no sólo como defensa antibacteriana sino también en la estimulación de la respuesta inmune específica (Nayak, 2010; Pérez-Sánchez *et al.*, 2013). Con el objetivo de estudiar el posible efecto estimulador de las ocho bacterias lácticas inactivadas y viables citadas anteriormente sobre el estallido respiratorio y la fagocitosis (Fig. 9.8) de leucocitos de riñón anterior de rodaballo se utilizó un ensayo colorimétrico en el que se determinó la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) y un ensayo de detección de partículas de zymosan marcadas con isotiocianato de fluoresceína por citometría de flujo, respectivamente (Capítulo VII). Los resultados obtenidos mostraron que las ocho bacterias lácticas fueron capaces de activar *in vitro* estos parámetros inmunológicos en leucocitos de rodaballo. La activación del estallido respiratorio se observó independientemente de la viabilidad de las bacterias lácticas; sin embargo, a las concentraciones más altas (10^7 y 10^8 ufc/ml), las bacterias lácticas viables mostraron una mayor estimulación del estallido respiratorio de los leucocitos (Fig. 2.; Capítulo VII). Además, todas las bacterias lácticas excepto *Lb. curvatus* BCS35 incrementaron significativamente la actividad fagocítica y el índice de fagocitosis ($p < 0,05$) sólo en sus formas viables (Fig. 3; Capítulo VII). Es importante destacar que las bacterias viables que produjeron un alto estallido respiratorio y fagocitosis (*L. cremoris* SMF110, *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71) indujeron un aumento de la muerte celular de los fagocitos (Tablas 1 y 2; Capítulo VII) en comparación con otras cepas, como *E. faecium* CV1, *P. pentosaceus* SMM73 y *P. pentosaceus* TPP3, que indujeron un menor estallido respiratorio a las concentraciones de 10^6 y 10^7 ufc/ml. Estos resultados sugieren una correlación entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) por las células fagocíticas y apoptóticas, como indican otros estudios realizados en mamíferos y peces (Quinn *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2011; Kepka *et al.*, 2014). Durante la fagocitosis, las células fagocíticas producen ROS a través de la activación de la NADPH oxidasa, actuando como mecanismo de defensa frente a los microorganismos patógenos (Quinn *et al.*, 2006). Cuando estos metabolitos reducidos del oxígeno están presentes en altos niveles, múltiples señales intracelulares que controlan el estrés oxidativo pueden activar la apoptosis y la muerte celular (Martindale y Holbrook, 2002).

Desafortunadamente, en este trabajo no se pudo establecer con todas las bacterias lácticas una correlación directa entre el estallido respiratorio y la muerte de las células fagocíticas, ya que *Lc. cremoris* SMM69 en su forma inactivada indujo un bajo estallido respiratorio a la concentración de 10^8 ufc/ml en comparación con *P. pentosaceus* SMM73, pero indujo significativamente la muerte celular de los fagocitos. Estos resultados sugieren que otros factores intrínsecos de las bacterias lácticas pueden estar implicados en la inducción o protección de la muerte de los leucocitos como, por ejemplo, diferentes propiedades antioxidantes de las bacterias lácticas; no obstante, sería necesario realizar más estudios para confirmar esta hipótesis.

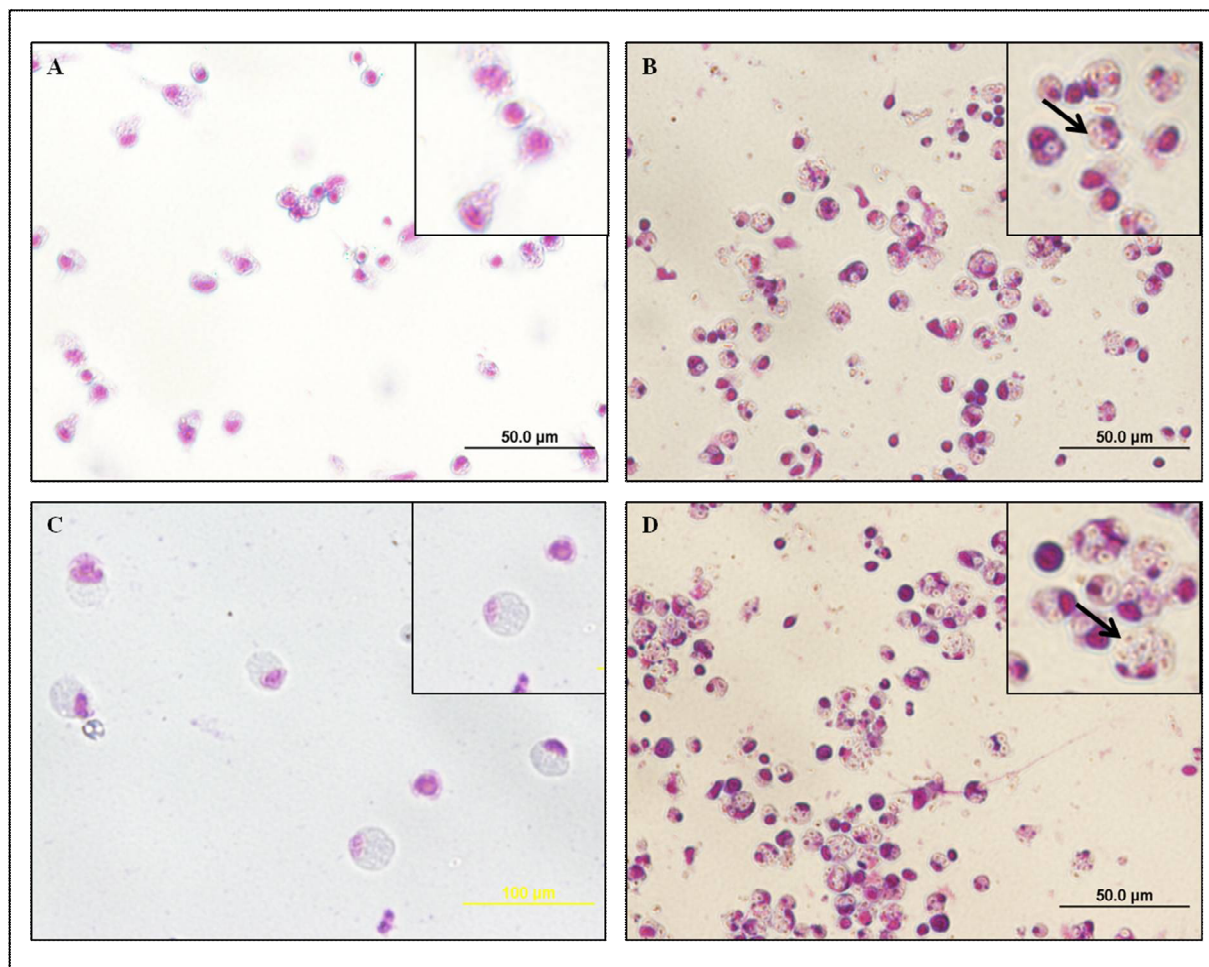


Figura 9.8. Imágenes de microscopía óptica de fagocitosis de partículas de zymosan por leucocitos de riñón anterior de rodaballo y sus correspondientes controles con tinción Hemacolor®. (A) Leucocitos sin tratar, (B) leucocitos en presencia de *W. cibaria* P71 inactivada y partículas de zymosan, (C) leucocitos en presencia de *W. cibaria* P71 viable y (D) leucocitos en presencia de *W. cibaria* P71 viable y partículas de zymosan. Las flechas indican leucocitos con partículas de zymosan en su citoplasma. Fuente: Imágenes del autor.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, la capacidad inmunomoduladora de las ocho bacterias lácticas resulta alterada por su viabilidad (Figs. 2 y 3; Capítulo VII). De forma similar, un estudio realizado por Panigrahi *et al.* (2005) puso de manifiesto que la capacidad de *Lb. rhamnosus* JCM 1136 para mejorar la actividad fagocítica y del complemento en trucha arcoíris era afectada por el

tratamiento térmico. El efecto dependiente de la viabilidad de la bacteria probiótica en la respuesta inmune puede ser debido a la modificación de la integridad estructural de la bacteria durante la exposición a altas temperaturas y la alteración de moléculas que desempeñan un papel importante en la inmunomodulación, como los MAMP. Además, los MAMP son producidos por distintas cepas bacterianas, siendo su composición y tamaño diverso, lo que podría explicar algunos efectos dependientes de cepa observados en este trabajo, como las diferencias en la estimulación del estallido respiratorio y la inducción de la apoptosis inducida por las bacterias lácticas sobre los leucocitos del riñón anterior de rodaballo. Sin embargo, es necesario realizar estudios *in vivo* que puedan evidenciar estos efectos en presencia de patógenos.

En conclusión, nuestro trabajo muestra diferentes efectos *in vitro* específicos de cepa en seis especies de bacterias lácticas evaluadas (*E. faecium*, *Lb. curvatus*, *L. cremoris*, *Lc. cremoris*, *P. pentosaceus* y *W. cibaria*) sobre los leucocitos de rodaballo. Además nuestros resultados indican que la viabilidad de los probióticos es un factor importante que influye en las propiedades inmunomoduladoras como el efecto en la viabilidad y la apoptosis de los leucocitos, el estallido respiratorio y la fagocitosis. Por último, nuestro trabajo revela que los ensayos *in vitro* son herramientas útiles para evaluar los efectos inmunomoduladores de los probióticos antes de desarrollar ensayos *in vivo* posteriores.

IX.6. EVALUACIÓN *in vitro* DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES Y PROBIÓTICAS DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN ACUÁTICO PARA SU EMPLEO COMO PROBIÓTICOS PARA EL CULTIVO DEL RODABALLO

El cultivo intensivo del rodaballo suele verse afectado por enfermedades de origen bacteriano como la tenacibaculosis y la vibriosis, que originan grandes pérdidas económicas en este sector. La tenacibaculosis (o flexibacteriosis) está originada por *T. maritimum*, un microorganismo Gram-negativo filamentoso que forma biopelículas y que afecta a peces marinos adultos y juveniles, originando lesiones ulcerativas y necróticas en la piel de toda la superficie del rodaballo (Fig. 9.8) (Toranzo *et al.*, 2005). Por otra parte, la vibriosis, causada por varias especies patógenas de *Vibrio* spp. y *Ms. anguillarum*, es una de las principales enfermedades bacterianas que provoca importantes pérdidas económicas en el cultivo de peces marinos (Toranzo *et al.*, 2005; Macpherson *et al.*, 2012). Una de las especies más relevantes es *V. splendidus*, un microorganismo Gram-negativo asociado a la producción de hemorragias internas, daño en el tracto intestinal y altas tasas de mortalidad en larvas de rodaballo (Fig. 9.9) alimentadas con presa viva (artemias y rotíferos) (Macpherson *et al.*, 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, la vacunación se ha utilizado para prevenir diversas enfermedades bacterianas; sin embargo, hasta la fecha sólo se ha desarrollado una vacuna frente a la tenacibaculosis (FM95) para prevenir la elevada mortalidad originada por *T. maritimum* en el cultivo

del rodaballo (Santos *et al.*, 1999) y, por otra parte, sólo están disponibles algunas vacunas inactivadas para prevenir la vibriosis clásica causada por *Ls. anguillarum* (Sommerset *et al.*, 2005). En este contexto, algunos estudios previos han descrito la efectividad de vacunas frente a *V. vulnificus* (Fouz *et al.*, 2001), *V. alginolyticus* (Moriñigo *et al.*, 2002), *V. harveyi* y *Ph. damsela* subesp. *piscicida* (Arijo *et al.*, 2005) en diferentes especies de peces, pero todavía no se ha desarrollado ninguna vacuna frente a *V. splendidus*, lo que pone de manifiesto el gran interés del empleo de probióticos para prevenir esta enfermedad en el rodaballo. Con el objeto de identificar entre las ocho bacterias lácticas seleccionadas por su actividad antimicrobiana directa frente a ictiopatógenos Gram-positivos y Gram-negativos y su seguridad *in vitro* (*E. faecium* CV1, *E. faecium* LPP29, *Lb. curvatus* BCS35, *L. cremoris* SMF110, *Lc. cremoris* SMM69, *P. pentosaceus* SMM73, *P. pentosaceus* TPP3 y *W. cibaria* P71), las de mayor actividad antimicrobiana frente a estos ictiopatógenos del rodaballo se utilizó la técnica de gota sobre agar (Cintas *et al.*, 1998a) frente a ocho microorganismos indicadores pertenecientes a las especies *T. maritimum* y *V. splendidus*. Todas las bacterias lácticas, excepto *Lb. curvatus* BCS35, mostraron actividad antimicrobiana directa frente a, al menos, cuatro de las ocho cepas evaluadas (Tabla 2; Capítulo VIII.). *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 fueron las cepas más activas, mostrando actividad antimicrobiana frente a todos los patógenos evaluados.

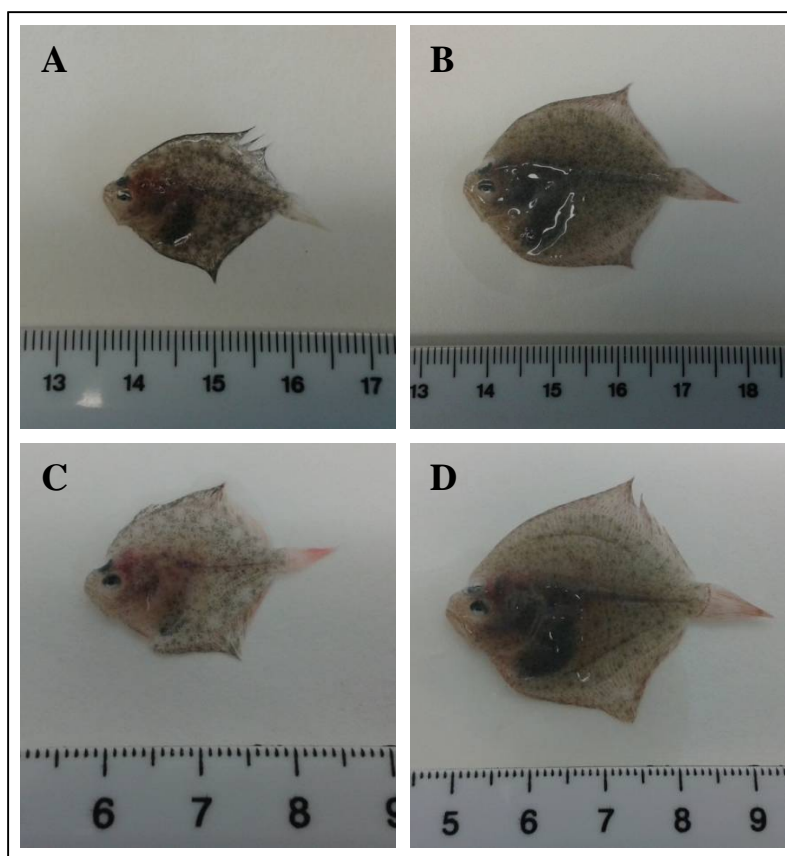


Figura 9.9. Larvas (A, C) y juveniles (B, D) de rodaballo afectados de vibriosis y tenacibaculosis, respectivamente. Fuente: Imágenes del autor.

Por otra parte, con el objeto de identificar la naturaleza de la actividad antimicrobiana ejercida por las bacterias lácticas, éstas se desarrollaron en medio líquido y se obtuvieron los correspondientes sobrenadantes para, posteriormente, evaluar su actividad antagonista mediante la técnica TDA (Cintas *et al.*, 1995). Los sobrenadantes de todas las bacterias lácticas evaluadas, excepto *Lb. curvatus* BCS35, inhibieron el crecimiento de *T. maritimum* NCIM2154 y *V. splendidus* CECT528. Asimismo, se detectó actividad antimicrobiana de los sobrenadantes después del tratamiento con proteinasa K y tratamiento térmico, pero ésta desapareció al ajustar los sobrenadantes a pH 6,2, sugiriendo que esta actividad es debida a la producción de ácidos orgánicos. A este respecto, como se ha mencionado anteriormente, la producción de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas activos frente a microorganismos patógenos es una propiedad deseable en las bacterias lácticas que se utilizan como probióticos en peces (Ringø y Gatesoupe, 1998; Vázquez *et al.*, 2005; Gatesoupe, 2008). Varios estudios describen la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas frente a ictiopatógenos (Balcázar *et al.*, 2008; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011a); sin embargo, muy pocos de ellos han permitido identificar bacterias lácticas con actividad antimicrobiana frente a *V. splendidus* (Ringø *et al.*, 2005; Villamil *et al.*, 2010) y, hasta la fecha, no se había descrito ningún trabajo en el que se demostrase la inhibición de *T. maritimum* por bacterias lácticas.

Los probióticos deben presentar una serie de características que les permitan ejercer su efecto beneficioso en el hospedador. De forma general, deben sobrevivir en el ambiente acuático y durante el tránsito por el tracto gastrointestinal del hospedador (*e.g.*, resistencia a pH bajo y bilis), así como colonizar el intestino y/o una superficie externa del hospedador, mediante su adherencia a las células epiteliales y mucosas para prevenir el establecimiento de bacterias potencialmente patógenas. Por todo ello, durante el proceso de selección de probióticos es importante la caracterización *in vitro* de sus propiedades funcionales (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011a). La supervivencia en medio acuático marino es una propiedad deseable para los cultivos probióticos que se van a emplear en acuicultura marina (Vázquez *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo revelaron que las ocho bacterias lácticas evaluadas sobrevivieron en el medio acuático marino a 18 °C durante 7 días (Tabla 3; Capítulo VIII). A este respecto, los porcentajes de supervivencia a las 24 y 48 h fueron del 48–98% y 17,6–78,8%, respectivamente. Sin embargo, a los 7 días estos porcentajes disminuyeron significativamente ($p < 0,01$) en todos los casos (0,002–29,5%), siendo *Lb. curvatus* BCS35 la cepa que presentó un menor porcentaje de supervivencia (0,002%) y *W. cibaria* P71 y *L. cremoris* SMF110 las que presentaron los mayores porcentajes de supervivencia (16,2–29,5%, respectivamente). Estos resultados están en concordancia con los de Villamil *et al.* (2010), quienes determinaron que *P. acidilactici* era capaz de sobrevivir en medio acuático marino durante más de 4 días, lo que se considera como tiempo suficiente para su absorción directa por las larvas de rodaballo.

El estudio de la resistencia al pH bajo y la bilis se ha sugerido como método para la evaluación de la capacidad de cepas probióticas para sobrevivir en el tracto gastrointestinal y poder así colonizar de

forma temporal las superficies mucosas (Nikoskelainen *et al.*, 2001a; Balcázar *et al.*, 2008; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011a); sin embargo, no hay consenso sobre la concentración de bilis que deben ser capaces de tolerar los probióticos de peces (Balcázar *et al.*, 2008). En nuestro trabajo, todas las bacterias lácticas evaluadas sobrevivieron a pH 3,0 durante 1,5 h, mostrando un porcentaje de supervivencia superior al 50%, y toleraron la bilis de rodaballo (10%, v/v) durante 1,5 h, mostrando un porcentaje de supervivencia superior al 90%, excepto *E. faecium* LPP29 (67,4%) y *P. pentosaceus* TPP3 (73,4%) (Tabla 3; Capítulo VIII). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios en los que se han evaluado bacterias lácticas para su empleo como probióticos (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC11842, *Lb. rhamnosus* ATCC53103, *L. lactis* CLFP101, *Lb. plantarum* CLFP238, *Lb. fermentum* CLFP242, *Lb. plantarum* CLFP3, *L. cremoris* CLFP25, *Lc. mesenteroides* CLFP68 y *Lb. paracasei* subsp. *tolerans* F2) (Nikoskelainen *et al.*, 2001a; Balcázar *et al.*, 2008; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011a; Sica *et al.*, 2012).

La adhesión al mucus es también una propiedad deseable para los probióticos, ya que puede prevenir la unión de los patógenos por exclusión competitiva a través del bloqueo de los receptores de adhesión al mucus, competencia por los nutrientes y/o producción de compuestos antimicrobianos (Juntunen *et al.*, 2001; Nikoskelainen *et al.*, 2001a). Con el objetivo de conocer las propiedades de adhesión de las ocho bacterias lácticas, se determinó (i) la hidrofobicidad de su superficie celular, utilizando el tolueno como solvente orgánico y (ii) su capacidad de adhesión al mucus de piel e intestino de rodaballo y a una superficie de poliestireno. Los resultados obtenidos revelaron que las ocho bacterias lácticas poseen una baja hidrofobicidad teniendo en cuenta el criterio propuesto por Ahumada *et al.* (1999), ya que los porcentajes de hidrofobicidad fueron inferiores al 35% (8,2–21,7%) (Fig. 1; Capítulo VIII). Conviene destacar que *E. faecium* CV1 y *E. faecium* LPP29 mostraron los valores más elevados de hidrofobicidad (21,7 y 18%, respectivamente) pero valores bajos de adhesión al mucus de piel de rodaballo (4,2 y 1,6%, respectivamente) y la superficie de poliestireno (3 y 2%, respectivamente), mientras que *Lb. curvatus* BCS35 mostró el valor más bajo de hidrofobicidad (8,23%) pero el más elevado de adhesión al mucus de piel y al poliestireno (21,7 y 21,4%, respectivamente). La ausencia de relación entre los valores de hidrofobicidad de la superficie celular y la capacidad de adhesión al mucus se ha observado también en otros estudios (Coquet *et al.*, 2002; Sica *et al.*, 2012), al igual que la variación de la hidrofobicidad según los diferentes solventes orgánicos empleados (Singh *et al.*, 2006). La adhesión de las bacterias lácticas al poliestireno fue similar a la adhesión al mucus de piel, lo que puede indicar un mecanismo inespecífico que podría estar mediado por uniones no covalentes o interacciones hidrofóbicas (Nikoskelainen *et al.*, 2001a; Balcázar *et al.*, 2008). Sin embargo, en todos los casos, la adhesión al mucus de piel fue significativamente mayor que al mucus de intestino ($p < 0,05$), lo que sugiere la existencia de mecanismos específicos de adhesión al mucus de piel en las cepas evaluadas. En este sentido, Balcázar *et al.* (2008) observaron que tres bacterias lácticas aisladas del intestino de trucha arcoíris mostraban una mayor unión al mucus de

intestino que al mucus de piel, lo que podría estar relacionado con la presencia de receptores específicos en el mucus intestinal (Roos y Jonsson, 2002). Sin embargo, Nikoskelainen *et al.* (2001a) observaron que la mayoría de los probióticos de origen humano se adherían de forma similar a mucus obtenido de distintas localizaciones en trucha arcoíris. En nuestro trabajo también se investigó la capacidad de las ocho bacterias lácticas para inhibir la adhesión de los patógenos *T. maritimum* NCIMB2154 y *V. splendidus* CECT528 al mucus de rodaballo. Para evaluar la inhibición de la adhesión al mucus de *T. maritimum* NCIMB2154 se utilizó mucus de piel, debido a que el desarrollo de la tenacibaculosis está asociado a lesiones en la superficie del pez (Faílde *et al.*, 2013); sin embargo, para los ensayos llevados a cabo con *V. splendidus* CECT528 se utilizó mucus intestinal porque esta especie bacteriana causa daños a nivel del tracto intestinal (Macpherson *et al.*, 2012). La adhesión de ambos patógenos resultó significativamente reducida por todas las bacterias lácticas (12,0–56,3%; $p < 0,01$) (Tabla 5; Capítulo VIII), excepto *E. faecium* CV1, que sólo fue efectiva reduciendo la adhesión de *V. splendidus* CECT528 al mucus intestinal (44,1%; $p < 0,01$). Las ocho cepas potencialmente probióticas mostraron su capacidad para inhibir la adhesión de los ictiopatógenos mediante la competición por los mismos receptores, independientemente de su actividad antimicrobiana y/o su capacidad de adhesión, lo que coincide con estudios *in vitro* realizados en otras especies de peces como trucha arcoíris (Balcázar *et al.*, 2008) y lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup) (Chabrillón *et al.*, 2005).

IX.7. EVALUACIÓN *in vivo* DE LA SEGURIDAD DE *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69 Y *Weissella cibaria* P71 Y DE SU EFECTO EN LA MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE DEL RODABALLO

Con base en los resultados descritos anteriormente, de las ocho bacterias lácticas preseleccionadas se seleccionaron *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71, aisladas de salmón Atlántico y pulpo, respectivamente, por su actividad antimicrobiana frente a los ictiopatógenos (*T. maritimum* y *V. splendidus*) y otras propiedades probióticas, así como por sus características funcionales (supervivencia en medio acuático marino y resistencia a la bilis y al bajo pH). Durante el proceso de selección de probióticos, la ausencia de patogenicidad para la especie hospedadora, el hombre y el medio ambiente tiene que ser evaluada convenientemente para poder considerarse una cepa segura (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011a). Con el objetivo de determinar la inocuidad de *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 se procedió a la evaluación *in vivo* de su efecto en larvas y juveniles de rodaballo mediante su inoculación por baño a concentraciones finales de 10^7 y 10^9 ufc/ml. Los resultados obtenidos mostraron que las larvas y juveniles de rodaballo bañados con ambas cepas sobrevivieron a los 21 días después del baño, lo que pone de manifiesto la ausencia de patogenicidad de estas bacterias lácticas.

La modulación del sistema inmune es otro mecanismo por el que los probióticos protegen a los peces frente a los ictiopatógenos (Nayak, 2010). En este contexto, el conocimiento de las propiedades inmunomoduladoras de los probióticos, principalmente sobre la mucosa, es esencial para conseguir el éxito en su aplicación en acuicultura (Lazado y Caipang, 2014b). Varios estudios han descrito el efecto inmunoestimulante de probióticos añadidos en la dieta de peces (Panigrahi *et al.*, 2007, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b; Standen *et al.*, 2013), pero en ningún trabajo se había evaluado la respuesta inmune tras la administración de probióticos por baño. Esta forma de administración sólo se ha utilizado para evaluar el efecto de inmunoestimulantes en la transcripción de citoquinas inflamatorias en juveniles de trucha arcoíris (Zhang *et al.*, 2009). Además, un estudio previo mostró que la administración de *P. acidilactici* directamente al agua de cultivo de larvas de rodaballo permitía una mayor absorción y un mayor aislamiento de esta cepa en el tracto gastrointestinal que la administración de probióticos vía rotíferos debido probablemente al continuo consumo de agua de las larvas (Villamil *et al.*, 2010). En este trabajo se investigó la expresión de genes de inmunidad en diferentes órganos (riñón anterior, bazo, hígado, intestino y piel) de juveniles de rodaballo después de la administración por baño de *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71. Para ello se determinó mediante PCR en tiempo real la transcripción de los genes que codifican la interleuquina 1- β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), lisozima, complemento (C3), complejo mayor de histocompatibilidad-I α (MHC-I α) y complejo mayor de histocompatibilidad-II α (MHC-II α).

Las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α son generalmente inducidas en etapas tempranas de la respuesta inmune y el estudio de sus niveles de transcripción se ha utilizado como marcador para evaluar la respuesta inflamatoria en peces (Zhang *et al.*, 2009; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b). En nuestro trabajo se detectó que la expresión del gen que codifica IL-1 β fue significativamente superior en la piel de rodaballo después del segundo baño con *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 en comparación con el control, mientras que la expresión del gen de TNF- α sólo aumentó en la piel después del primer baño con *Lc. cremoris* SMM69. La estimulación de estos genes también se ha descrito en riñón anterior y/o bazo de trucha arcoíris (Kim y Austin, 2006b; Panigrahi *et al.*, 2007, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011b), riñón anterior de lubina (Román *et al.*, 2013), intestino de tilapia (Standen *et al.*, 2013) y riñón anterior de pez globo (Biswas *et al.*, 2013) alimentados con bacterias lácticas o utilizando cocultivos de líneas celulares de peces y bacterias lácticas probióticas. A pesar de la estimulación de la transcripción de los genes que codifican estas citoquinas proinflamatorias observada en nuestro trabajo, la expresión del gen de IL-1 β disminuyó significativamente en otros órganos como riñón anterior, bazo, hígado o intestino. A este respecto, como se ha mencionado anteriormente, no hay estudios previos acerca del efecto de la administración de probióticos por baño en el sistema inmune de peces; sin embargo, existe un estudio en el que el baño de trucha arcoíris con el patógeno *Aeromonas salmonicida* indujo la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-8, TNF- α e IFN- γ en el intestino proximal (Mulder *et al.*, 2007). De manera similar, la infección de trucha arcoíris con el parásito ciliado

Ichthyophthirius multifiliis incrementó la expresión del gen de IL-1 β , primero en el riñón anterior y bazo y después en la piel (Sigh *et al.*, 2004). Este aumento significativo de la expresión de citoquinas proinflamatorias en la piel de rodaballo podría estar relacionado con la forma de administración de los probióticos (baño), que favorecería la estimulación de la respuesta inmune en las mucosas. En este sentido, los rodaballos bañados con estas cepas podrían tener un estado inmunológico activado que les permitirá generar una mejor respuesta inmune frente a las infecciones a través de la piel, considerada como la principal vía de entrada de *T. maritimum* y otros patógenos de peces (Standen *et al.*, 2013). Por otra parte, la lisozima es la primera línea de defensa en la inmunidad innata de los peces (Pridgeon *et al.*, 2010). En nuestro trabajo, el primer baño con *W. cibaria* P71 estimuló de forma significativa la transcripción del gen que codifica la lisozima en ambos tejidos de la superficie mucosa (piel e intestino), mientras que después del segundo baño con *Lc. cremoris* SMM69 o *W. cibaria* P71, los niveles de transcripción sólo aumentaron significativamente en la piel. En este contexto, Caipang *et al.* (2010) observaron que los transcritos del gen que codifica la lisozima en el riñón anterior de bacalao Atlántico aumentaron en presencia de la cepa *Psychrobacter* sp. GP11, mientras que otras cepas evaluadas no estimularon la transcripción de este gen. La estimulación de la transcripción del gen que codifica la lisozima en peces alimentados con probióticos ha sido previamente descrita en el intestino y hepatopáncreas de langostino tigre (Maeda *et al.*, 2014). Asimismo, otros autores han descrito el incremento de la actividad lisozima en suero de peces alimentados con bacterias lácticas probióticas (Balcázar *et al.*, 2007b; Ferguson *et al.*, 2010). Por otra parte, en el sistema inmune de los peces, el complemento es un sistema de proteínas fundamental para el reconocimiento y eliminación de patógenos, siendo la proteína C3 el componente central del mismo (Boshra *et al.*, 2006; Whyte, 2007). En nuestro trabajo se observó un aumento de los transcritos del gen que codifica C3 después del primer baño con *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 en el bazo, pero después del segundo baño los niveles de este transcrito disminuyeron. Sin embargo, los niveles de los transcritos del gen que codifica C3 en las mucosas sólo se incrementaron después del primer baño con *W. cibaria* P71. Panigrahi *et al.* (2007) observaron la activación del complemento en truchas arcoíris alimentadas con pienso suplementado con *E. faecium* y *B. subtilis*. Asimismo, Nikoskelainen *et al.* (2003) describieron que la adición de *Lb. rhamnosus* incrementaba la actividad del complemento de trucha arcoíris después de dos semanas de suplementación con el pienso y la cepa probiótica, pero cuando se retiró el probiótico la actividad del complemento volvió a ser similar a la del grupo control. Por otra parte, MHC-Ia y MHC-IIa se encargan de la presentación de los péptidos antigénicos sobre la superficie celular de las células presentadoras de antígenos para que sean reconocidos por las células del sistema inmune, como linfocitos T y células NK (del inglés, *Natural Killer*) (Neefjes *et al.*, 2011). Ambos complejos desempeñan un papel muy importante en la respuesta inmune y el reconocimiento de antígenos externos, por lo que su expresión puede afectar a la susceptibilidad de los peces a enfermedades (Ni *et al.*, 2014). En este trabajo, el baño de los juveniles de rodaballo con *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria*

P71 no estimuló la transcripción de los genes que codifican MHC-I α y MHC-II α . A este respecto, ambas cepas disminuyeron la transcripción del gen que codifica MHC-II α en el intestino después del segundo baño y *Lc. cremoris* SMM69 disminuyó la transcripción de MHC-I α después del primer baño.

En conclusión, los resultados de los ensayos *in vivo* revelan que *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 son inocuas para las larvas y juveniles de rodaballo. Asimismo, ponen de manifiesto que ambas cepas poseen la capacidad de modular la transcripción de genes de inmunidad, especialmente los relacionados con la inmunidad inespecífica en los tejidos mucosos. Conviene destacar que, según nuestros conocimientos, este es el primer estudio que describe la modulación de la transcripción de genes de inmunidad en diversos órganos de peces bañados con probióticos. Finalmente, los resultados de este trabajo de investigación sugieren la idoneidad de *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 para ser utilizadas como probióticos para el cultivo intensivo del rodaballo.

CAPÍTULO X

Conclusiones

PRIMERA. La actividad antimicrobiana frente a ictiopatógenos Gram-positivos y Gram-negativos es una propiedad probiótica generalizada entre las bacterias lácticas aisladas de pescado, marisco y productos de la pesca caracterizadas en este trabajo.

SEGUNDA. De las 99 bacterias lácticas evaluadas, 33 (8 *Enterococcus faecium*, 11 *Pediococcus pentosaceus*, 1 *Lactobacillus sakei* subesp. *carneus*, 1 *Lactobacillus curvatus* subesp. *curvatus*, 3 *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, 3 *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* y 6 *Weissella cibaria*) pueden considerarse seguras debido a la ausencia de resistencia a antibióticos, factores de virulencia y actividades enzimáticas perjudiciales.

TERCERA. La resistencia a antibióticos y/o los factores de virulencia se detectaron en todas las cepas de *Enterococcus faecalis*, en *Enterococcus faecium* (79%) y, en menor medida, en las cepas no enterococales (37,5%). En este trabajo se describe por primera vez el gen que confiere resistencia a la eritromicina (*mef*[A/E]) en los géneros *Pediococcus* y *Weissella*, así como el gen de resistencia a lincosamidas (*lnu*[A]) en el género *Pediococcus*.

CUARTA. Ninguna de las bacterias lácticas de origen acuático presentó actividades histidina y ornitina descarboxilasa ni los genes que codifican la producción de las respectivas enzimas (*hdc* y *odc*, respectivamente); sin embargo, todos los enterococos presentaron el gen que codifica la tirosina descarboxilasa (*tdc*), detectándose esta actividad enzimática en todos ellos excepto en las cepas *Enterococcus faecium* BCS59 y *Enterococcus faecium* MV5, que poseen una secuencia de inserción integrada en la región promotora de *tdc* que impediría la transcripción de este gen.

QUINTA. De las técnicas evaluadas para la tipificación molecular de los enterococos (PFGE, RAPD, ERIC-PCR y ARDRA), la técnica ERIC-PCR fue la más eficaz. De acuerdo con los criterios establecidos por la EFSA, todos los enterococos se consideraron seguros por ser sensibles a la ampicilina y por no presentar marcadores de virulencia asociados a cepas hospitalarias (proteína de superficie enterococal [*esp*], glicosil hidrolasa [*hyl*_{Efm}] y secuencia de inserción IS16).

SEXTA. Este es el primer estudio a gran escala que evalúa la seguridad *in vitro* de bacterias lácticas de origen acuático empleando una aproximación más exhaustiva que la establecida por la EFSA para las bacterias lácticas con estatus QPS. El protocolo desarrollado constituye una estrategia adecuada como método de identificación y selección de bacterias lácticas potencialmente seguras para su empleo como probióticos en acuicultura.

SÉPTIMA. Este es el primer estudio que describe bacterias lácticas con actividad antimicrobiana frente a *Vibrio campbellii* y su efecto bactericida frente a este ictiopatógeno en cocultivos. Los ensayos de exposición de cultivos gnotobióticos de *Artemia franciscana* mostraron que *Enterococcus faecium*

CV1 y *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* SMF161 protegen a este crustáceo frente a *Vibrio campbellii*.

OCTAVA. Este es el primer estudio en el que se evalúa *in vitro* el efecto de bacterias lácticas viables e inactivadas sobre leucocitos de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). Las 8 bacterias lácticas inactivadas evaluadas no mostraron efecto citotóxico en los leucocitos de rodaballo, mientras que sus formas viables ejercieron distintos efectos en la apoptosis de linfocitos y fagocitos. Las bacterias lácticas viables estimularon el estallido respiratorio y la fagocitosis de los leucocitos más eficientemente que sus formas inactivadas. Estos resultados indican la existencia de diversos mecanismos de interacción cepa-específicos entre estas bacterias lácticas y los leucocitos de rodaballo.

NOVENA. De las 8 bacterias lácticas evaluadas, 7 presentaron actividad antimicrobiana frente a los ictiopatógenos del rodaballo *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio splendidus* y la mayoría de ellas mostraron unas adecuadas propiedades funcionales y probióticas, tales como supervivencia en medio acuático marino, tolerancia a valores de pH bajos y a bilis de rodaballo, adhesión al mucus de piel de rodaballo e inhibición de la adhesión de *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio splendidus* a este mucus y al del intestino.

DÉCIMA. *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69 y *Weissella cibaria* P71 resultaron inocuas *in vivo* para las larvas y juveniles de rodaballo tras su administración mediante baño.

UNDÉCIMA. Este es el primer estudio que describe la modulación de la transcripción de genes de inmunidad en diversos órganos de peces expuestos a bacterias lácticas mediante baño. *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69 y *Weissella cibaria* P71 poseen la capacidad de modular la transcripción de genes de inmunidad (interleuquina-1 β , factor de necrosis tumoral- α , lisozima, complemento, complejo mayor de histocompatibilidad-Ia y complejo mayor de histocompatibilidad-IIa) en riñón anterior, bazo, hígado, intestino y piel, especialmente los genes relacionados con la inmunidad inespecífica (interleuquina-1 β , lisozima y complemento) en las mucosas de juveniles de rodaballo.

DUODÉCIMA. Los resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo* demuestran que las cepas *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69 y *Weissella cibaria* P71 poseen un gran potencial como probióticos para el cultivo del rodaballo.

CHAPTER X

Conclusions

FIRST. The antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive fish pathogens is a common probiotic property amongst the lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products characterized in this work.

SECOND. From the 99 lactic acid bacteria which were tested, 33 (8 *Enterococcus faecium*, 11 *Pediococcus pentosaceus*, 1 *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*, 1 *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, 3 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 3 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* and 6 *Weissella cibaria*) might be considered as safe due to the lack of antibiotic resistances, virulence factors and detrimental enzymatic activities.

THIRD. Antibiotic resistances and/or virulence factors were detected in all the strains of *Enterococcus faecalis*, in *Enterococcus faecium* (79%) and, to a lesser extent, in the non-enterococcal strains (37.5%). This work describes for the first time the gene conferring resistance to erythromycin (*mef*[A/E]) in the genera *Pediococcus* and *Weissella*, and the gene responsible for the resistance to lincosamides (*lnu*[A]) in the genus *Pediococcus*.

FOURTH. None of the lactic acid bacteria showed neither histidine and ornithine decarboxylase activities nor the genes encoding the corresponding decarboxylase activities (*hdc* and *odc*, respectively); however, all the enterococcal strains harboured the gene encoding the tyrosine decarboxylase (*tdc*), and all of them showed this enzymatic activity but *Enterococcus faecium* BCS59 and MV5, which harboured an insertion sequence upstream *tdc* that could hamper the transcription of this gene.

FIFTH. From the techniques evaluated for the molecular typification of enterococci (PFGE, RAPD, ERIC-PCR and ARDRA), ERIC-PCR was the most effective. According to the EFSA guidelines, all the enterococci were considered as safe since they were sensitive to ampicillin and did not harbour any of the virulence markers associated with hospital-associated strains (enterococcal surface protein [*esp*], glycosyl hydrolase [*hyl*_{Efm}] and IS16 insertion sequence).

SIXTH. This is the first large-scale study evaluating the *in vitro* safety of lactic acid bacteria of aquatic origin using an approximation more exhaustive than that established by EFSA for lactic acid bacteria awarded with the QPS status. The protocol developed constitutes an adequate subtractive screening strategy for the identification and selection of potentially safe lactic acid bacteria intended for use as probiotics in aquaculture.

SEVENTH. This is the first study describing lactic acid bacteria with antimicrobial activity against *Vibrio campbellii* and their bactericidal effect against this fish pathogen in co-cultures. The gnotobiotic challenge tests using *Artemia franciscana* showed that *Enterococcus faecium* CV1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMF161 protect this crustacean against *Vibrio campbellii*.

EIGHTH. This is the first study evaluating the *in vitro* effect of viable and inactivated lactic acid bacteria on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) leucocytes. The 8 tested lactic acid bacteria showed no cytotoxic effect on turbot leucocytes while viable lactic acid bacteria exerted different effects on apoptosis of turbot phagocytes and lymphocytes. Viable lactic acid bacteria stimulated the leucocyte respiratory burst activity and phagocytosis more efficiently than their corresponding inactivated forms. These results indicate the existence of diverse strain-specific mechanisms of interaction between these lactic acid bacteria and turbot leucocytes.

NINTH. From the 8 tested lactic acid bacteria, 7 displayed antimicrobial activity against the turbot pathogens *Tenacibaculum maritimum* and *Vibrio splendidus*, and most of them showed interesting functional and probiotic properties, such as survival in seawater, tolerance to low pH and turbot bile, adhesion to turbot skin mucus, and inhibition of the adhesion of *Tenacibaculum maritimum* and *Vibrio splendidus* to this mucus and intestinal mucus.

TENTH. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* SMM69 and *Weissella cibaria* P71 were shown to be harmless *in vivo* for turbot larvae and juveniles after bathing administration.

ELEVENTH. This is the first study describing the modulation of the transcription of fish immunity-related genes in several organs of fish bathed with lactic acid bacteria. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* SMM69 and *Weissella cibaria* P71 modulated the transcription of immunity-associated genes (interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , lysozyme, complement, major histocompatibility complex-I α and major histocompatibility complex-II α) in head-kidney, spleen, liver, intestine and skin, especially the non-specific immunity genes (interleukin-1 β , lysozyme and complement) in the mucosal tissues of turbot juveniles.

TWELFTH. The results of the *in vitro* and *in vivo* assays demonstrate that *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* SMM69 and *Weissella cibaria* P71 possess a great potential as probiotics in turbot farming.

CAPÍTULO XI

Trabajo futuro

Como se ha descrito en esta memoria, en esta Tesis Doctoral se procedió a la caracterización y evaluación *in vitro* e *in vivo* de bacterias lácticas, aisladas previamente por nuestro grupo investigador de pescado, marisco y productos de la pesca, para su empleo como probióticos para el cultivo del rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.), una especie de gran interés comercial para España. En primer lugar, se evaluó *in vitro* la actividad antimicrobiana directa y extracelular de las bacterias lácticas de origen acuático frente a ictiopatógenos Gram-positivos y Gram-negativos, así como su seguridad empleando una aproximación más exhaustiva que la establecida por la EFSA para las bacterias lácticas con estatus QPS (*e.g.*, susceptibilidad a antibióticos y detección genotípica y/o fenotípica de factores de virulencia y actividades enzimáticas perjudiciales) y se llevó a cabo la tipificación molecular de cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de pescado y productos de la pesca y otros alimentos. Posteriormente, se procedió a la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas de origen acuático en medio sólido y en cocultivos frente a *Vibrio campbellii*, así como a la evaluación *in vivo* de su eficacia para la protección de *Artemia franciscana* frente a este ictiopatógeno empleando ensayos de exposición de cultivos gnotobióticos (axénicos). Asimismo, se evaluaron *in vitro* los efectos de las bacterias lácticas de origen acuático viables e inactivadas en la viabilidad y respuesta inmune innata (estallido respiratorio y fagocitosis) de leucocitos de riñón anterior de rodaballo. Además, se evaluaron *in vitro* sus propiedades funcionales y probióticas (*e.g.*, supervivencia en el medio acuático marino y a las condiciones del tracto gastrointestinal [resistencia a pH bajo y bilis de rodaballo], hidrofobicidad de la superficie celular, adhesión al mucus de piel e intestino de rodaballo e inhibición de la adhesión al mucus de los ictiopatógenos que afectan al cultivo del rodaballo [*Vibrio splendidus* y *Tenacibaculum maritimum*]). Por último, se evaluó *in vivo* la seguridad de dos cepas (*Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69 y *Weissella cibaria* P71), seleccionadas previamente por su seguridad *in vitro* y por presentar unas adecuadas características probióticas y funcionales, para larvas y juveniles de rodaballo, así como su capacidad para modular la expresión de genes de inmunidad (interleuquina-1 β [IL-1 β], factor de necrosis tumoral- α [TNF- α], lisozima, complemento [C3], complejo mayor de histocompatibilidad-Ia [MHC-Ia] y complejo mayor de histocompatibilidad-IIa [MHC-IIa]) en cinco órganos (riñón anterior, bazo, hígado, intestino y piel) de juveniles de rodaballo. Conviene destacar que los resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo* realizados en este trabajo de investigación permiten considerar a *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 como dos cepas con un gran potencial para ser empleadas como probióticos para el cultivo del rodaballo.

Como continuación del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se propone la continuidad de esta línea de investigación sobre la caracterización y evaluación de bacterias lácticas de origen acuático para su empleo como probióticos para el cultivo del rodaballo. A este respecto, se pretende evaluar *in vivo* el efecto de *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 en la protección de larvas y juveniles de rodaballo frente a los ictiopatógenos *V. splendidus* y *T. maritimum*, respectivamente. Para ello, las bacterias lácticas se administrarán en el pienso (1,5% biomasa; 10⁷–10⁹ ufc/g; 2 veces/día; 21 días), por

baño (10^7 – 10^9 ufc/ml; 1 h), directamente en el agua de cultivo a diario (10^5 ufc/ml; 21 días) y/o mediante su bioencapsulación en *A. franciscana* (10^9 ufc/ml; 21 días) a lotes de larvas y/o juveniles mantenidos en tanques con oxigenación y sistemas para controlar el fotoperiodo y la temperatura del agua (18 °C). Las larvas y juveniles de rodaballo tratados con bacterias lácticas se infectarán (día 21) con cepas virulentas de *V. splendidus* (larvas de rodaballo) y *T. maritimum* (juveniles de rodaballo) por baño (10^7 y 10^9 ufc/ml, respectivamente; 1 h), monitorizándose la mortalidad de los peces. Posteriormente, se tomarán muestras de órganos internos de larvas y juveniles para detectar los ictiopatógenos por metodologías microbiológicas y genotípicas. Además, en el caso de los juveniles de rodaballo, se evaluará el efecto de las bacterias lácticas en la expresión de genes relacionados con la inmunidad (IL-1 β , TNF- α , lisozima, C3, MHC-I α y MHC-II α) en cinco órganos (riñón anterior, bazo, hígado, intestino y piel) empleando la técnica de PCR en tiempo real. Una vez evaluada la capacidad de las bacterias lácticas para proteger a las larvas y los juveniles de rodaballo frente a *V. splendidus* y *T. maritimum*, respectivamente, se pretende monitorizar *in vivo* su capacidad para colonizar las larvas y juveniles de rodaballo. Para ello, en primer lugar, se procederá al desarrollo de herramientas y técnicas moleculares que permitan el marcado específico de las bacterias lácticas. En este contexto, se marcarán las bacterias lácticas mediante bioluminiscencia y/o fluorescencia, amplificando por PCR los genes del operón *luxABCDE* de pLuxMCI y los genes *gfpuv* de pGFPuv (Clontech) y pVenus, respectivamente, para clonarlos posteriormente en diversos plásmidos (pMG36c/pMG36e, pINT29 o pELS200) y expresarlos en las correspondientes bacterias lácticas. Una vez marcadas las bacterias lácticas, se evaluará y monitorizará *in vivo* su capacidad para (i) colonizar el tracto gastrointestinal y las mucosas superficiales de las larvas y los juveniles de rodaballo y sus respectivos medios acuáticos y (ii) protegerlos frente a sus ictiopatógenos, empleando para ellos ensayos *in vivo* similares a los descritos anteriormente. Posteriormente, se abordará un aspecto de gran relevancia que consiste en la evaluación del efecto del empleo de los cultivos probióticos en la estructura y dinámica poblacional de la microbiota del rodaballo, así como de su respectivo medio acuático. A este respecto, la microbiota cultivable mayoritaria (total y láctica) tras los tratamientos probióticos *in vivo* con *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 se caracterizará empleando metodologías microbiológicas y metagenómicas (PCR-DGGE [del inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*]-secuenciación y secuenciación nucleotídica masiva). Otro aspecto que está teniendo un gran interés durante estos últimos años, y que también se abordará como parte del trabajo futuro, es el estudio de las proteínas de la superficie celular y proteínas secretadas por las bacterias lácticas probióticas con funciones de (i) adhesión al mucus y células epiteliales; (ii) modulación de la función de las células epiteliales e inmunes, e (iii) inducción de cambios en la expresión de genes de las células del hospedador, lo que permitirá determinar y caracterizar algunos de los principales mecanismos de acción por los que estas cepas ejercen sus efectos beneficiosos. A este respecto, para identificar las proteínas producidas por *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 se procederá a su extracción a partir del *pellet* celular o de los sobrenadantes filtrados y concentrados de los cultivos bacterianos (para las proteínas de superficie celular y las

secretadas, respectivamente) para su posterior análisis mediante electroforesis bidimensional (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) seguida de su digestión enzimática para la identificación de los perfiles peptídicos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*). Por último, se procederá a la secuenciación y análisis funcional del genoma de *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71, lo que reviste un gran interés científico-técnico y aplicado. A este respecto, la información obtenida permitirá la comparación de sus genomas con los de otras bacterias lácticas de la misma especie y distintos orígenes disponibles actualmente, así como la identificación de los determinantes genéticos relacionados con sus características probióticas, entre los que se incluyen los genes involucrados en su (i) actividad antimicrobiana frente a ictiopatógenos (bacteriocinogénica o no), (ii) adhesión a las mucosas, (iii) supervivencia bajo condiciones de estrés (*e.g.*, bajos valores de pH y elevadas concentraciones de ácidos orgánicos, NaCl y sales biliares), (iv) capacidad de estimulación de la respuesta inmune (tanto innata como adaptativa) y (v) metabolismo energético de hidratos de carbono, proteínas y lípidos. Asimismo, esta información permitirá la aplicación futura de diversas técnicas *-ómicas* (proteómicas, metabolómicas, genómicas y transcriptómicas) que permitan determinar las condiciones experimentales óptimas para que estas y otras bacterias lácticas ejerzan sus efectos como probióticos, y, por tanto, para el desarrollo de cultivos comerciales de interés para el cultivo del rodaballo y, probablemente, de otras especies de interés comercial para la acuicultura marina y continental española.

CAPÍTULO XII

Bibliografía

- Abasali, H. y S. Mohamad.** 2010. Effect of dietary supplementation with probiotic on reproductive performance of female livebearing ornamental fish. *Res. J. Anim. Sci.*, 4: 103–107.
- Abbass, A., S. M. Sharifuzzaman y B. Austin.** 2010. Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 33: 31–37.
- Abowei, F. N. y O. F. Briyai.** 2011. A review of some basic parasite diseases in culture fisheries: flagellids, dinoflagellides and ichthyophthiriasis, ichthyobodiasis, coccidiosis trichodiniasis, heminthisis, hirudinea infestation, crustacean parasite and ciliates. *Brit. J. Pharmacol. Toxicol.*, 2: 213–226.
- Achard, A., C. Villers, V. Pichereau y R. Leclercq.** 2005. New *lnu(C)* gene conferring resistance to lincomycin by nucleotidylation in *Streptococcus agalactiae* UCN36. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 2716–2719.
- Adams, M. R.** 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.*, 68: 171–178.
- Adams, M. R. y P. Marteau.** 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol.*, 27: 263–264.
- Adams, M. R. y L. Nicolaides.** 1997. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8: 227–239.
- Aguirre, M. y M. D. Collins.** 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 95–107.
- Aguirre-Guzmán, G., H. Mejía Ruíz y F. Ascencio.** 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. *Aquac. Res.*, 35: 1395–1404.
- Ahumada, M. C., M. E. Colloca, M. E. López, A. Pesce de Ruiz Holgado y M. E. Nader-Macias.** 1999. Characterization of lactobacilli isolated from the tongue and gum. *Anaerobe*, 5: 129–135.
- Albarracín Orio, A. G., G. E. Piñas, P. R. Cortes, M. B. Cian y J. Echenique.** 2011. Compensatory evolution of *pbp* mutations restores the fitness cost imposed by beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.*, 7: e1002000.
- Alkhatib, Z., A. Abts, A. Mavaro, L. Schmitt y S. H. Smits.** 2012. Lantibiotics: how do producers become self-protected? *J. Biotechnol.*, 159: 145–154.
- Almeida, A., Á. Cunha, N. C. Gomes, E. Alves, L. Costa y M. A. Faustino.** 2009. Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Mar. Drugs*, 7: 268–313.
- Almeida, T., A. Brandão, E. Muñoz-Atienza, A. Gonçalves, C. Torres, G. Igrejas, P. E. Hernández, C. Herranz, L. M. Cintas y P. Poeta.** 2011. Identification of bacteriocin genes in enterococci isolated from game animals and saltwater fish. *J. Food Prot.*, 74: 1252–1260.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389–3402.
- Álvarez-Pellitero, P.** 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 126: 171–198.
- Alves, V. F., E. C. P. d. Martinis, M. T. Destro, B. F. Vogel y L. Gram.** 2005. Antilisterial activity of *Carnobacterium piscicola* isolated from Brazilian smoked fish (surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from surubim. *J. Food Prot.*, 68: 2068–2077.

- Aly, S. M., Y. Abdel-Galil Ahmed, A. Abdel-Aziz Ghareeb y M. F. Mohamed.** 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 128–136.
- Ammor, M. S., A. B. Flórez y B. Mayo.** 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.*, 24: 559–570.
- Amores, R., A. Calvo, J. R. Maestre y D. Martínez-Hernández.** 2004. Probióticos. *Rev. Esp. Quimioterap.*, 17: 131–139.
- Anderson, D. P.** 1997. Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish. *Dev. Biol. Stand.*, 90: 257–265.
- Angulo, S., A. Morales, S. Danese, L. Llacuna, M. C. Masamunt, N. Pultz, M. G. Cifone, C. De Simone, S. Delgado, J. Vila, J. Panés, C. Donskey, J. C. Fernández-Checa, C. Fiocchi y M. Sans.** 2011. Probiotic sonicates selectively induce mucosal immune cells apoptosis through ceramide generation via neutral sphingomyelinase. *PLoS One*, 6: e16953.
- APROMAR (Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos).** 2014. La acuicultura en España 2014.
- Araújo, C., C. Torres, A. Gonçalves, C. Carneiro, M. López, H. Radhouani, M. Pardal, G. Igrejas y P. Poeta.** 2011. Genetic detection and multilocus sequence typing of vanA-containing *Enterococcus* strains from mullets fish (*Liza ramada*). *Microb. Drug Resist.*, 17: 357–361.
- Araújo, C., E. Muñoz-Atienza, T. Pérez-Sánchez, J. L. Múzquiz, P. Poeta, G. Igrejas, P. E. Hernández, C. Herranz, I. Ruiz-Zarzuela y L. M. Cintas.** 2013. Nisin Z production by *Lactococcus lactis* WF6-67 as a defense mechanism to protect rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Lactococcus garvieae* infection. V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, p.129. Abstracts, BioMicroWorld, Madrid, Spain.
- Araújo, C., E. Muñoz-Atienza, P. E. Hernández, C. Herranz, L. M. Cintas, G. Igrejas, and P. Poeta.** 2015a. Evaluation of *Enterococcus* spp. from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), feed, and rearing environment against fish pathogens. *Foodborne Pathog. Dis.*, 12: 311–322.
- Araújo, C., E. Muñoz-Atienza, T. Pérez-Sánchez, P. Poeta, G. Igrejas, P. E. Hernández, C. Herranz, I. Ruiz-Zarzuela y L. M. Cintas.** 2015b. Nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WA2-67 of aquatic origin as a defense mechanism to protect rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Lactococcus garvieae*. Manuscrito enviado para su publicación en *Marine Biotechnology*.
- Arias, C. A. y B. E. Murray.** 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 10: 266–278.
- Arijo, S., R. Rico, M. Chabrilón, P. Díaz-Rosales, E. Martínez-Manzanares, M. C. Balebona, B. Magariños, A. E. Toranzo y M. A. Morinigo.** 2005. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J. Fish Dis.*, 28: 33–38.
- Aubin, J., F. J. Gatesoupe, L. Labbé y L. Lebrun.** 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquac. Res.*, 36: 758–767.
- Austin, B.** 2006. The bacterial microflora of fish. *The Scientific World J.*, 6: 931–945.

- Austin, B., E. Baudet y M. Stobie.** 1992. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *J. Fish Dis.*, 15: 55–61.
- Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Robertson, I. Effendi y D. R. W. Griffith.** 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.*, 18: 93–96.
- Avendaño-Herrera, R., A. E. Toranzo, J. L. Romalde, M. L. Lemos y B. Magarinos.** 2005. Iron uptake mechanisms in the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 6947–6953.
- Avendaño-Herrera, R., A. E. Toranzo y B. Magarinos.** 2006. Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Dis. Aquat. Organ.*, 71: 255–266.
- Axelsson, L., T. Katla, M. Bjornslett, V. G. H. Eijsink y A. Holck.** 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 168: 137–143.
- Ayeni, F. A., B. A. Adeniyi, S. T. Ogunbanwo, R. Tabasco, T. Paarup, C. Peláez y T. Requena.** 2009. Inhibition of uropathogens by lactic acid bacteria isolated from dairy foods and cow's intestine in western Nigeria. *Arch. Microbiol.*, 191: 639–648.
- Ayeni, F. A., B. Sánchez, B. A. Adeniyi, C. G. de Los Reyes-Gavilán, A. Margolles y P. Ruas-Madiedo.** 2011. Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *Int. J. Food Microbiol.*, 147: 97–104.
- Bairagi, A., K. Sarkar Ghosh, S. K. Sen y A. K. Ray.** 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquacult. Int.*, 10: 109–121.
- Bairagi, A., K. Sarkar Ghosh, S. K. Sen y A. K. Ray.** 2004. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. *Aquac. Res.*, 35: 436–446.
- Bakkal, S., S. M. Robinson y M. A. Riley.** 2012. Bacteriocins of aquatic microorganisms and their potential applications in the seafood industry. En: “*Health and environment in aquaculture*”, pp. 303–328, 1ª edición. Carvalho, E. D., G. Silva David y R. J. Silva (eds.). InTech, Rijeka, Croacia.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell y J. L. Múzquiz.** 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.*, 114: 173–186.
- Balcázar, J. L., T. Rojas-Luna y D. P. Cunningham.** 2007a. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following immersion challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 96: 147–150.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruíz-Zarzuela, D. Vendrell, O. Girones y J. L. Múzquiz.** 2007b. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 51: 185–193.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, A. C. Calvo, I. Márquez, O. Gironés y J. L. Muzquiz.** 2007c. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *Br. J. Nutr.*, 97: 522–527.
- Balcázar, J. L., D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, J. L. Muzquiz y O. Girones.** 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278: 188–191.
- Baruah, K., J. Ranjan, P. Sorgeloos y P. Bossier.** 2010. Efficacy of heterologous and homologous heat shock protein 70s as protective agents to *Artemia franciscana* challenged with *Vibrio campbellii*. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 733–739.

- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris y M. Turck.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 493–496.
- Begley, M., C. G. Gahan y C. Hill.** 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 625–651.
- Ben Omar, N., A. Castro, R. Lucas, H. Abriouel, N. M. K. Yousif, C. M. A. P. Franz, W. H. Holzapfel, R. Pérez-Pulido, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27: 118–130.
- Bermúdez-Humarán, L. G., P. Kharat, J. M. Chatel y P. Langella.** 2011. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microb. Cell Fact.*, 10: S4.
- Bernardeau, M., J. P. Vernoux, S. Henri-Dubernet y M. Gueguen.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 278–285.
- Berridge, M. V., P. M. Herst y A. S. Tan.** 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 11: 127–152.
- Bessis, D., A. L. Quellec, A. Sotto, C. Pérez y A. J. Ciurana.** 1995. *Lactobacillus acidophilus* endocarditis after an appendectomy. *Clin. Infect. Dis.*, 20: 724–725.
- Betro, M. C.** 1996. Hieroglyphics: the writings of ancient Egypt. 251 pp. Abbeville Press Publishers, New York, NY, EE.UU., English ed.
- Billman-Jacobe, H.** 1996. Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. *Curr. Op. Biotechnol.*, 7: 500–504.
- Biswas, G., H. Korenaga, R. Nagamine, H. Takayama, S. Kawahara, S. Takeda, Y. Kikuchi, B. Dashnyam, T. Kono y M. Sakai.** 2013. Cytokine responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) head kidney cells induced with heat-killed probiotics isolated from the Mongolian dairy products. *Fish Shellfish Immunol.*, 34: 1170–1177.
- Björkroth, K. J., R. Geisen, U. Schillinger, N. Weiss, P. d. Vos, W. H. Holzapfel, H. J. Korkeala y P. Vandamme.** 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified atmosphere conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 3764–3772.
- Blackwell, B.** 1963. Hypertensive crisis due to monoamine-oxidase inhibitors. *The Lancet*, 282: 849–851.
- Boesen, H. T., M. H. Larsen, J. L. Larsen y A. E. Ellis.** 2001. *In vitro* interactions between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages and *Vibrio anguillarum* serogroup O2a. *Fish Shellfish Immunol.*, 11: 415–431.
- Bonetta, S., E. Carraro, J. D. Coisson, F. Travaglia y M. Arlorio.** 2008. Detection of biogenic amine producer bacteria in a typical Italian goat cheese. *J. Food Prot.*, 71: 205–209.
- Borch, E., M. L. Kant-Muermans y Y. Blixt.** 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 103–120.
- Boshra, H., J. Li y J. O. Sunyer.** 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 20: 239–262.
- Bover-Cid, S. y W. H. Holzapfel.** 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 53: 33–41.

- Bozdogan, B., L. Berrezouga, M. S. Kuo, D. A. Yurek, K. A. Farley, B. J. Stockman y R. Leclercq.** 1999. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 925–929.
- Bravo, J. A., P. Forsythe, M. V. Chew, E. Escaravage, H. M. Savignac, T. G. Dinan, J. Bienenstock y J. F. Cryan.** 2011. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 16050–16055.
- Bricknell, I. y R. A. Dalmo.** 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 457–472.
- Brock, J. A. y R. Bullis.** 2001. Disease prevention and control for gametes and embryos of fish and marine shrimp. *Aquaculture*, 197: 137–159.
- Brudeseth, B. E., R. Wiulsd, B. N. Fredriksen, K. Lindmo, K. E. Lokling, M. Bordevik, N. Steine, A. Klevan y K. Gravningen.** 2013. Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol*, 35: 1759–1768.
- Brunt, J. y B. Austin.** 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 28: 693–701.
- Brunt, J., A. Newaj-Fyzul y B. Austin.** 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 30: 573–579.
- Bucio, A., R. Hartemink, J. W. Schrama, J. Verreth y F. M. Rombouts.** 2006. Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with recirculation system. *Food Microbiol.*, 23: 476–482.
- Buckenhüskes, H. J.** 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 253–272.
- Bujalance, C., E. Moreno, M. Jiménez-Varela y A. Ruiz-Bravo.** 2007. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *Int. J. Food Microbiol.*, 113: 28–34.
- Burbank, D. R., D. H. Shah, S. E. LaPatra, G. Fornshell y K. D. Cain.** 2011. Enhanced resistance to coldwater disease following feeding of probiotic bacterial strains to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 321: 185–190.
- Burbank, D. R., S. E. LaPatra, G. Fornshell y K. D. Cain.** 2012. Isolation of bacterial probiotic candidates from the gastrointestinal tract of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), and screening for inhibitory activity against *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.*, 35: 809–816.
- Cabello, F. C.** 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, 8: 1137–1144.
- Cai, Y., P. Suyanandana, P. Saman y Y. Benno.** 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 45: 177–184.
- Caipang, C. M. A., M. F. Brinchmann y V. Kiron.** 2010. Antagonistic activity of bacterial isolates from intestinal microbiota of Atlantic cod, *Gadus morhua*, and an investigation of their immunomodulatory capabilities. *Aquac. Res.*, 41: 249–256.
- Campbell, I.** 1997. Beer. En: “*Food microbiology: fundamentals and frontiers*”, pp. 662–670. Doyle, M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (eds.). ASM Press, Nueva York, NY, EE.UU.

- Cannon, J. P., T. A. Lee, J. T. Bolanos y L. H. Danziger.** 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 24: 31–40.
- Caplice, E. y G. F. Fitzgerald.** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 131–149.
- Carnevali, O., M. Zamponi, R. Sulpizio, A. Rollo, M. Nardi, C. Orpianesi, S. Silvi, M. Caggiano, A. Polzonetti y A. Cresci.** 2004. Administration of probiotic strain to Improve sea bream wellness during development. *Aquacult. Int.*, 12: 377–386.
- Carnevali, O., L. de Vivo, R. Sulpizio, G. Gioacchini, I. Olivotto, S. Silvi y A. Cresci.** 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, 258: 430–438.
- Carol, M., N. Borruel, M. Antolin, M. Llopis, F. Casellas, F. Guarner y J. R. Malagelada.** 2006. Modulation of apoptosis in intestinal lymphocytes by a probiotic bacteria in Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.*, 79: 917–922.
- Carr, F. J., D. Chill y N. Maida.** 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28: 281–370.
- Casalta, E. y M. C. Montel.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 271–273.
- Casaus, P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes, P. E. Hernández y H. Holo.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology*, 143: 2287–2294.
- Castex, M., L. Chim, D. Pham, P. Lemaire, N. Wabete, J. L. Nicolas, P. Schmidely y C. Mariojous.** 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture*, 275: 182–193.
- Castex, M., P. Lemaire, N. Wabete y L. Chim.** 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 294: 306–313.
- Castex, M., P. Lemaire, N. Wabete y L. Chim.** 2010. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish Shellfish Immunol.*, 28: 622–631.
- Castro, N., A. E. Toranzo, S. Núñez y B. Magariños.** 2008. Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 208–212.
- Cattoir, V., L. Poirel, D. Mazel, C.-J. Soussy y P. Nordmann.** 2007. *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51: 2650–2651.
- CE (Comisión Europea).** 2012a. La acuicultura: un potencial que desarrollar. *Pesca y acuicultura en Europa*, 56: 1–16.
- CE.** 2012b. La acuicultura: un potencial que desarrollar. *Pesca y acuicultura en Europa*, 58: 1–16.
- Cerezuela, R., F. A. Guardiola, J. Meseguer y M. A. Esteban.** 2012. Enrichment of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) diet with microalgae: effects on the immune system. *Fish Physiol. Biochem.*, 38: 1729–1739.

- Cerezuela, R., J. Meseguer y M. A. Esteban.** 2013. Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 34: 843–848.
- Cetinkaya, Y., P. Falk y C. G. Mayhall.** 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13: 686–707.
- Chabrilón, M. y M. A. Moriño.** 2007. ¿Pueden los peces comer yogur? <http://www.encuentros.uma.es/encuentros89/peces.htm>.
- Chabrilón, M., R. M. Rico, M. C. Balebona y M. A. Moriño.** 2005. Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J. Fish Dis.*, 28: 229–237.
- Chabrilón, M., P. Díaz-Rosales, M. C. Balebona y M. A. Moriño.** 2007. Panorama Acuícola Magazine, marzo/abril: 28–34.
- Chan, J. F. W., P. C. Y. Woo, J. L. L. Teng, S. K. P. Lau, S. S. M. Leung, F. C. C. Tam y K. Y. Yuen.** 2011. Primary infective spondylodiscitis caused by *Lactococcus garvieae* and a review of human *L. garvieae* infections. *Infection*, 39: 259–264.
- Chang, C. I. y W. Y. Liu.** 2002. An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Fish Dis.*, 25: 311–315.
- Chatterjee, C., M. Paul, L. Xie y W. A. van der Donk.** 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.*, 105: 633–684.
- Cheigh, C. I. y Y. R. Pyun.** 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.*, 27: 1641–1648.
- Chiu, C. H., Y. K. Guu, C. H. Liu, T. M. Pan y W. Cheng.** 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immunol.*, 23: 364–377.
- Chiu, Y. H., Y. J. Hsieh, K. W. Liao y K. C. Peng.** 2010. Preferential promotion of apoptosis of monocytes by *Lactobacillus casei rhamnosus* soluble factors. *Clin. Nutr.*, 29: 131–140.
- Choi, S.-H. y T.-J. Yoon.** 2008. Non-specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary heat-inactivated potential probiotics. *Immune Netw.*, 8: 67–74.
- Chythanya, R., I. Karunasagar y I. Karunasagar.** 2002. Inhibition of shrimp pathogenic vibrios by a marine *Pseudomonas* I-2 strain. *Aquaculture*, 208: 1–10.
- Cintas, L. M. y P. Casaus.** 1998. La necesidad de conservar los alimentos. Bioconservación. *Alim. Equip. Tecnol.*, diciembre: 89–95.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández y H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havårstein, P. E. Hernández y I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4321–4330.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes y L. S. Havarstein.** 1998a. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.*, 180: 1988–1994.

- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández y P. E. Hernández.** 1998b. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.*, 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000a. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (I). Ácidos orgánicos, metabolitos del oxígeno y productos finales del catabolismo. *Alim. Equip. Tecnol.*, julio-agosto: 83–90.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000b. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (II). Bacteriocinas. *Alim. Equip. Tecnol.*, septiembre: 109–119.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000c. Bacterias lácticas de origen alimentario. Consideraciones taxonómicas y filogenéticas. *Alimentaria*, 318: 61–70.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Havarstein, H. Holo, P. E. Hernandez y I. F. Nes.** 2000d. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.*, 182: 6806–6814.
- Cintas, L. M., M. P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes y P. E. Hernández.** 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Tech. Int.*, 7: 281–305.
- Claesson, M. J., D. van Sinderen y P. W. O'Toole.** 2007. The genus *Lactobacillus*—a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 269: 22–28.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).** 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational supplement M100–S21. Wayne, PA, EE.UU.
- Collins, B., P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross.** 2010. Application of lactic acid bacteria-produced bacteriocins. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 89–109, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Collins, M. D., J. Samelis, J. Metaxopoulos y S. Wallbanks.** 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 595–603.
- Connil, N., Y. Le Breton, X. Dousset, Y. Auffray, A. Rince y H. Prevost.** 2002. Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 3537–3544.
- Coquet, L., P. Cosette, G.-A. Junter, E. Beucher, J.-M. Saiter y T. Jouenne.** 2002. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Colloid Surf. B*, 26: 373–378.
- Corr, S. C., Y. Li, C. U. Riedel, P. W. O'Toole, C. Hill y C. G. Gahan.** 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 7617–7621.
- Corral, M. L., H. Grizel, J. Montes y E. Polanco.** 1999. La acuicultura: biología, regulación, fomento, nuevas tendencias y estrategia comercial. En: “*Tomo I: Análisis del desarrollo de los cultivos: medio, agua y especies*”, pp. 1–19. Grupo Mundi-Prensa. Fundación Alfonso Martín Escudero, Madrid, España, Grupo Mundi-Prensa ed. .
- Costantini, A., M. Cersosimo, V. Del Prete y E. García-Moruno.** 2006. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *J. Food Prot.*, 69: 391–396.

- Coton, E. y M. Coton.** 2005. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 63: 296–304.
- Coton, E. y M. Coton.** 2009. Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiol.*, 26: 52–57.
- Coton, M., E. Coton, P. Lucas y A. Lonvaud.** 2004. Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. *Food Microbiol.*, 21: 125–130.
- Cotter, P. D., C. Hill y R. P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.*, 3: 777–788.
- Crane, M. y A. Hyatt.** 2011. Viruses of fish: an overview of significant pathogens. *Viruses*, 3: 2025–2046.
- Cui, Y., C. Zhang, Y. Wang, J. Shi, L. Zhang, Z. Ding, X. Qu y H. Cui.** 2012. Class Ila bacteriocins: diversity and new developments. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 16668–16707.
- Daeschel, M. A.** 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.*, 43.
- Daeschel, M. A., D.-S. Jung y B. T. Watson.** 1991. Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 601–603.
- Dalmin, G., K. Kathiresan y A. Purushothaman.** 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J. Exp. Biol.*, 39: 939–942.
- Dang, H., X. Zhang, L. Song, Y. Chang y G. Yang.** 2007. Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *J. Appl. Microbiol.*, 103: 2580–2592.
- Danielsen, M. y A. Wind.** 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.*, 82: 1–11.
- Danielsen, M., P. J. Simpson, E. B. O'Connor, R. P. Ross y C. Stanton.** 2007. Susceptibility of *Pediococcus* spp. to antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol.*, 102: 384–389.
- Danilova, N., J. Bussmann, K. Jekosch y L. A. Steiner.** 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.*, 6: 295–302.
- Das, S., L. R. Ward y C. Burke.** 2010. Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 305: 32–41.
- Davies, E. A. y J. Delves-Broughton.** 2000. Nisin. En: “*Encyclopedia of food microbiology*”, pp. 183–191. Robinson, R. K., C. A. Batt y P. D. Patel (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- de Giaksa, V.** 1889. Ueber das Verhalten einiger pathogener Mikroorganismen im Meerwasser. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 6: 162–224.
- de Paola, A., J. T. Peeler y G. E. Rodrick.** 1995. Effect of oxytetracycline-medicated feed on antibiotic resistance of gram-negative bacteria in catfish ponds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2335–2340.
- de Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K.-H. Schleifer y W. B. Whitman.** 2009. The Firmicutes. En: “*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*”, vol. 3, 2ª edición. Springer, Nueva York, NY, EE.UU.

- de Vuyst, L. y E. J. Vandamme.** 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En: “*Bacteriocins of lactic acid bacteria*”, pp. 9–129. de Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Oxford, Reino Unido.
- de Vuyst, L. y F. Leroy.** 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13: 194–199.
- de Vuyst, L., M. R. Foulquié-Moreno y H. Revets.** 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.*, 84: 299–318.
- Decamp, O. y D. Moriarty.** 2007. Aquaculture species profit from probiotics. *Feed Mix*, 15: 20–23.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill y P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16: 1058–1071.
- Defoirdt, T., R. Crab, T. K. Wood, P. Sorgeloos, W. Verstraete y P. Bossier.** 2006. Quorum sensing-disrupting brominated furanones protect the gnotobiotic brine shrimp *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 6419–6423.
- Defoirdt, T., D. Halet, H. Vervaeren, N. Boon, T. Van de Wiele, P. Sorgeloos, P. Bossier y W. Verstraete.** 2007a. The bacterial storage compound poly-beta-hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environ. Microbiol.*, 9: 445–452.
- Defoirdt, T., N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete y P. Bossier.** 2007b. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends Biotechnol.*, 25: 472–479.
- Defoirdt, T., W. Verstraete y P. Bossier.** 2008. Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. *J. Appl. Microbiol.*, 104: 1480–1487.
- Defoirdt, T., P. Sorgeloos y P. Bossier.** 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.*, 14: 251–258.
- Del'Duca, A., D. Evangelista Cesar, C. Galuppo Diniz y P. C. Abreu.** 2013. Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent in situ hybridization technique. *Aquaculture*, 388–391: 115–121.
- del Grosso, M., F. Iannelli, C. Messina, M. Santagati, N. Petrosillo, S. Stefani, G. Pozzi y A. Pantosti.** 2002. Macrolide efflux genes *mef(A)* and *mef(E)* are carried by different genetic elements in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 774–778.
- Delgado, S., E. O'Sullivan, G. Fitzgerald y B. Mayo.** 2007. Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *J. Food Sci.*, 72: M310–M315.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans y J. Hugenholtz.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. A. *Van Leeuw.*, 69: 193–202.
- Descheemaeker, P., C. Lammens, B. Pot, P. Vandamme y H. Goossens.** 1997. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *Int J Syst Bacteriol.*, 47: 555–561.
- Desriac, F., D. Defer, N. Bourgougnon, B. Brillet, P. Le Chevalier y Y. Fleury.** 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar. Drugs*, 8: 1153–1177.

- Dhert, P., G. Rombaut, G. Suantika y P. Sorgeloos.** 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200: 129–146.
- Díaz-Rosales, P., I. Salinas, A. Rodríguez, A. Cuesta, M. Chabrilón, M. C. Balebona, M. A. Moriño, M. A. Esteban y J. Meseguer.** 2006. Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish Shellfish Immunol*, 20: 482–492.
- Díaz-Rosales, P., M. Chabrilón, R. T. Abdala, F. L. Figueroa, M. C. Balebona y M. A. Moriño.** 2008. Effect of dietary administration of *Porphyridium cruentum* on the respiratory burst activity of sole, *Solea senegalensis* (Kaup), phagocytes. *J. Fish Dis.*, 31: 489–495.
- Díaz-Rosales, P., S. Arijó, M. Chabrilón, F. J. Alarcón, S. T. Tapia-Paniagua, E. Martínez-Manzanares, M. C. Balebona y M. A. Moriño.** 2009. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 293: 16–21.
- Diep, D. B. y I. F. Nes.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets*, 3: 107–122.
- Dieye, Y., A. J. W. Hoekman, F. Clier, V. Juillard, H. J. Boot y J.-C. Piard.** 2003. Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 7281–7288.
- Dimitroglou, A., D. L. Merrifield, O. Carnevali, S. Picchietti, M. Avella, C. Daniels, D. Güroy y S. J. Davies.** 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production – A Mediterranean perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 30: 1–16.
- Dixon, B. A.** 1994. Antibiotic resistance of bacterial fish pathogens. *J. World Aquacult. Soc.*, 25: 60–63.
- Doménech, A., J. F. Fernández-Garayzábal, C. Pascual, J. A. Garcia, M. T. Cutuli, M. A. Moreno, M. D. Collins y L. Domínguez.** 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *J. Fish Dis.*, 19: 33–38.
- Donabedian, S. M., L. A. Thal, E. Hershberger, M. B. Perri, J. W. Chow, P. Bartlett, R. Jones, K. Joyce, S. Rossiter, K. Gay, J. Johnson, C. Mackinson, E. Debess, J. Madden, F. Angulo y M. J. Zervos.** 2003. Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 1109–1113.
- Donohue, D. C., S. Salminen y P. Marteau.** 1995. Safety of probiotic bacteria. En: “*Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*”, pp. 369–383, 2ª edición. Salminen, S. y A. von Wright (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen y H. Prévost.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70: 564–582.
- Dufour, A., T. Hindré, D. Haras y J. P. L. Pennec.** 2007. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31: 134–167.
- Eaton, T. J. y M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1628–1635.
- EC (European commission).** 2003. On a generic approach to the safety assessment of microorganisms used in feed/food and feed/food production - A working paper open for comment. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf.

- EFSA (European Food Safety Authority).** 2004. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. QPS: qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed. European Food Safety Authority, Bruselas, Bélgica.
- EFSA.** 2005a. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *The EFSA J.*, 226: 1–12.
- EFSA.** 2005b. QPS-Qualified Presumption of Safety micro-organisms in food and feed. EFSA Scientific Colloquium, Summary Report, octubre 2005.
- EFSA.** 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA J.*, 587: 1–16.
- EFSA.** 2008a. Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed trout. *Annex I to the EFSA J.*, 796: 1–97.
- EFSA.** 2008b. Food safety considerations of animal welfare aspects of husbandry systems for farmed fish. *The EFSA J.*, 867: 1–24.
- EFSA.** 2011. Maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *The EFSA J.*, 9: 1–82.
- EFSA.** 2012a. Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA J.*, 10: 2682.
- EFSA.** 2012b. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.*, 10: 2740–2749.
- Ekert, P. G. y D. L. Vaux.** 1997. Apoptosis and the immune system. *Br. Med. Bull.*, 53: 591–603.
- Elmadfa, I., P. Klein y A. L. Meyer.** 2010. Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Nutr. Soc.*, 69: 416–420.
- Ellis, A. E.** 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 291–308.
- Ennahar, S., K. Sonomoto y A. Ishizaki.** 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.*, 87: 705–716.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto y A. Ishizaki.** 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 85–106.
- Faílde, L. D., A. P. Losada, R. Bermúdez, Y. Santos y M. I. Quiroga.** 2013. *Tenacibaculum maritimum* infection: pathology and immunohistochemistry in experimentally challenged turbot (*Psetta maxima* L.). *Microb. Pathog.*, 65: 82–88.
- Falagas, M. E., G. I. Betsi y S. Athanasiou.** 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 13: 657–664.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).** 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fish. Tech. Pap.*, 469: 1–97.
- FAO.** 2005-2014. Cultured aquatic species information programme. *Psetta maxima*. Text by Rodríguez Villanueva, J. L., Fernández Souto, B. En: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome, Italy. Updated 4 May 2005. [Cited 31 January 2014]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Psetta_maxima/en#tcNA014C.
- FAO.** 2006. FAO Fisheries Department. State of world aquaculture 2006. *FAO Fish. Tech. Pap.*, 500: 1-134.

- FAO.** 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia.
- FAO.** 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization).** 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of joint FAO/WHO working group. London, Ontario, Canada. 11 p.
- FAO/WHO** 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food Nutr. Pap.*, 85: 1–50.
- FAO/NACA/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization/Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific).** 1999. Joint Study Group. Food safety issues associated with products from aquaculture. *WHO Technical Report Series*, 883: 1–68.
- Farzanfar, A.** 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 48: 149–158.
- Federation of European Aquaculture Producers (FEAP) secretariat.** 2013. European aquaculture production report 2003–2012, 52 p.
- Ferguson, R. M., D. L. Merrifield, G. M. Harper, M. D. Rawling, S. Mustafa, S. Picchietti, J. L. Balcázar y S. J. Davies.** 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Microbiol.*, 109: 851–862.
- Fernández Casal, J.** 2013. Acuicultura en Galicia: balance de 25 años y perspectivas para los siguientes 25. *Trébol*, 66: 1–17.
- Fernández, M., D. M. Linares, A. Rodríguez y M. A. Álvarez.** 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73: 1400–1406.
- Fimland, G., L. Johnsen, B. Dalhus y J. Nissen-Meyer.** 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Pept. Sci.*, 11: 688–696.
- Fjellheim, A. J., G. Klinkenberg, J. Skjermo, I. M. Aasen y O. Vadstein.** 2010. Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Vet. Microbiol.*, 144: 153–159.
- Fleet, G. H.** 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 101–117.
- Fleet, G. H.** 2001. Wine. En: “*Food Microbiology: fundamentals and frontiers*”, pp. 671–694. Doyle, M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (eds.). ASM Press, Nueva York, NY., EE.UU.
- Foulquié-Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou y L. d. Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.*, 106: 1–24.
- Fouz, B., M. D. Esteve-Gassent, R. Barrera, J. L. Larsen, M. E. Nielsen y C. Amaro.** 2001. Field testing of a vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus*. *Dis. Aquat. Organ.*, 45: 183–189.
- Franz, C. M. A. P. y W. H. Holzapfel.** 2012. Examples of lactic-fermented foods of the African continent. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 265–284, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds.). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Franz, C. M. A. P., W. H. Holzapfel y M. E. Stiles.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 1–24.

- Franz, C. M. A. P., M. E. Stiles, K. H. Schleifer y W. H. Holzapfel.** 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 105–122.
- Franz, C. M. A. P., G.-S. Cho, W. H. Holzapfel y A. Gálvez.** 2010. Safety of lactic acid bacteria. En: “*Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*”, pp. 341–359, 1ª edición. Mozzi, F., R. R. Raya y G. M. Vignolo (eds.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Freitas, A. R., A. P. Tedim, C. Novais, P. Ruiz-Garbajosa, G. Werner, J. A. Laverde-Gómez, R. Cantón, L. Peixe, F. Baquero y T. M. Coque.** 2010. Global spread of the *hylEfm* colonization-virulence gene in megaplasms of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54: 2660–2665.
- Fryer, J. L. y R. P. Hedrick.** 2003. Piscirickettsia salmonis: a Gram-negative intracellular bacterial pathogen of fish. *J. Fish Dis.*, 26: 251–262.
- Fuller, R.** 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 365–378.
- Galdeano, C. M. y G. Perdigon.** 2006. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin. Vaccine Immunol.*, 13: 219–226.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López y N. Ben Omar.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120: 51–70.
- García-Moruno, E., A. V. Carrascosa y R. Muñoz.** 2005. A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography. *J. Food Prot.*, 68: 625–629.
- Gardiner, E. G., R. P. Ross, P. M. Kelly, C. Stanton, J. U. D. Collins y G. Fitzgerald.** 2002. Microbiology of therapeutic milks. En: “*Dairy Microbiology Handbook*”, pp. 431–466. Robinson, R. K. (ed.). J. Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Garneau, S., N. I. Martin y J. C. Vederas.** 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84: 577–592.
- Garza-Velasco, R., K. Hernández-Acosta y A. G. Mejía-Chávez.** 2002. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. *LABORAT-acta*, 14.
- Gasser, F.** 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur*, 92: 45–67.
- Gatesoupe, F. J.** 1991. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 96: 335–342.
- Gatesoupe, F. J.** 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. *Aquat. Living Resour.*, 7: 277–282.
- Gatesoupe, F. J.** 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147–165.
- Gatesoupe, F. J.** 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia* nauplii as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture*, 212: 347–360.
- Gatesoupe, F. J.** 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 107–114.
- Geisen, R. y W. H. Holzapfel.** 1996. Genetically modified starter and protective cultures. *Int. J. Food Microbiol.*, 30: 315–324.

- Ghittino, C., M. Latini, F. Agnetti, C. Panzieri, L. Lauro, R. Ciappelloni y G. Petracca.** 2003. Emerging pathologies in aquaculture: effects on production and food safety. *Vet. Res. Commun.*, 27 Suppl 1: 471–479.
- Ghosh, S., A. Sinha y C. Sahu.** 2008. Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquacult. Nutr.*, 14: 289–299.
- Gibson, G. R. y M. B. Roberfroid.** 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125: 1401–1412.
- Gibson, L. F., J. Woodworth y A. M. George.** 1998. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*, 169: 111–120.
- Gildberg, A., H. Mikkelsen, E. Sandaker y E. Ringø.** 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, 352: 279–285.
- Gilmore, M. S., R. A. Segarra, M. C. Booth, C. P. Bogie, L. R. Hall y D. B. Clewell.** 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.*, 176: 7335–7344.
- Gill, H. S., J. Prasad y O. Donkor.** 2012. Probiotics and human immune function. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 439–508, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds.). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Gillor, O., A. Etzion y M. A. Riley.** 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81: 591–606.
- Giraffa, G.** 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.*, 12: 291–299.
- Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26: 163–171.
- Giraffa, G.** 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28: 251–260.
- Giri, S. S., S. S. Sen y V. Sukumaran.** 2012. Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol.*, 32: 1135–1140.
- Giri, S. S., V. Sukumaran y M. Oviya.** 2013. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol.*, 34: 660–666.
- Gobeli, S., E. Goldschmidt-Clermont, J. Frey y S. E. Burr.** 2009. *Pseudomonas chlororaphis* strain JF3835 reduces mortality of juvenile perch, *Perca fluviatilis* L., caused by *Aeromonas sobria*. *J. Fish Dis.*, 32: 597–602.
- Goldberg, S., R. J. Doyle y M. Rosenberg.** 1990. Mechanism of enhancement of microbial cell hydrophobicity by cationic polymers. *J. Bacteriol.*, 172: 5650–5654.
- Goldin, B. R. y S. L. Gorbach.** 2008. Clinical indications for probiotics: an overview. *Clin. Infect. Dis.*, 46 Suppl 2: S96–S100.
- Gomes, B. C., C. T. Esteves, I. C. Palazzo, A. L. Darini, G. E. Felis, L. A. Sechi, B. D. Franco y E. C. De Martinis.** 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.*, 25: 668–675.

- Gómez, D., J. O. Sunyer y I. Salinas.** 2013. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. *Fish Shellfish Immunol.*, 35: 1729–1739.
- Gómez-Gil, B., S. Soto-Rodríguez, A. García-Gasca, A. Roque, R. Vázquez-Juárez, F. L. Thompson y J. Swings.** 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, 150: 1769–1777.
- Gómez-Sala, B.** 2013. Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino. Caracterización bioquímica y genética y producción heteróloga de las curvacinas G14 y G15 de *Lactobacillus curvatus* BCS35. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Gómez-Sala, B., A. Basanta, J. Sánchez, M. Martín, R. Criado, J. Gutiérrez, R. Citti, C. Herranz, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2004. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and fish products. 13^{ème} Colloque du Club des Bactéries Lactiques, p. 45. Abstracts, ENITIAA and French National Institute for Agricultural Research (INRA), Nantes, Francia.
- Gómez-Sala, B., E. Muñoz-Atienza, J. Sánchez, A. Basanta, C. Herranz, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2015. Bacteriocin production by Lactic Acid Bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *Eur. Food Res. Technol.* In press.
- Gonçalves, L. M. D., A. Ramos, J. S. Almeida, A. M. R. B. Xavier y M. J. T. Carrondo.** 1997. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 48: 346–350.
- González, C. J., T. M. López-Díaz, M. L. García-López, M. Prieto y A. Otero.** 1999. Bacterial microflora of Wild brown trout (*Salmo trutta*), Wild pike (*Esox lucius*) and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Food Prot.*, 62: 1270–1277.
- González Serrano, J. L.** 2001. Evolución histórica y situación actual de la acuicultura en el mundo y en España. pp. 91–97. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, España. Disponible en http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/fondo/pdf/29259_8.pdf.
- Gorospe, J. N., K. Nakamura, M. Abe y S. Higashi.** 1996. Nutritional contribution of *Pseudomonas* sp. in *Artemia* culture. *Fisheries Sci.*, 62: 914–918.
- Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber y T. F. Nielsen.** 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 969–973.
- Guder, A., I. Wiedemann y H.-G. Sahl.** 2000. Posttranslationally modified bacteriocins: the lantibiotics. *Biopolymers (Pept. Sci.)*, 55: 62–73.
- Gullian, M., F. Thompson y J. Rodriguez.** 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 233: 1–14.
- Haenen, O. L., J. J. Evans y F. Berthe.** 2013. Bacterial infections from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses. *Rev. Sci. Tech.*, 32: 497–507.
- Hagi, T., D. Tanaka, Y. Iwamura y T. Hoshino.** 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture* 234: 335–346.
- Hai, N. V., R. Fotadar y N. Buller.** 2007. Selection of probiotics by various inhibition test methods for use in the culture of western king prawns, *Penaeus latissulcatus* (Kishinouye). *Aquaculture*, 272: 231–239.

- Hai, N. V., N. Buller y R. Fotedar.** 2009. Effects of probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *Pseudomonas aeruginosa*) on the growth, survival and immune parameters of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquac. Res.*, 40: 590–602.
- Halász, A., A. Baráth, L. Simon-Sarkadi y W. Holzapfel.** 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Tech.*, 5: 42–49.
- Hameed, A. S. S., P. V. Rao, J. J. Farmer, F. W. Hickman-Brenner y G. R. Fanning.** 1996. Characteristics and pathogenicity of a *Vibrio campbellii*-like bacterium affecting hatchery-reared *Penaeus indicus* (Milne Edwards, 1837) larvae. *Aquac. Res.*, 27: 853–863.
- Hansen, J. D., E. D. Landis y R. B. Phillips.** 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 6919–6924.
- Harikrishnan, R., C. Balasundaram y M. S. Heo.** 2010. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 868–874.
- Hartnett, D. J., A. Vaughan y D. v. Sinderen.** 2002. Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from raw barley and sorghum. *J. Inst. Brew.*, 108: 169–177.
- Harzevili, A. R. S., H. van Duffel, P. Dhert, J. Swings y P. Sorgeloos.** 1998. Use of a potential probiotic *Lactococcus lactis* AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *Aquac. Res.*, 29: 411–417.
- Hatha, M., A. A. Vivekanandhan, G. J. Joice y Christol.** 2005. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *Int. J. Food Microbiol.*, 98: 131–134.
- Heavey, P. M. y I. R. Rowland.** 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Gastrointestinal cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 18: 323–336.
- Heikens, E., M. J. Bonten y R. J. Willems.** 2007. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J. Bacteriol.*, 189: 8233–8240.
- Heikens, E., K. V. Singh, K. D. Jacques-Palaz, M. van Luit-Asbroek, E. A. Oostdijk, M. J. Bonten, B. E. Murray y R. J. Willems.** 2011. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. *Microbes Infect.*, 13: 1185–1190.
- Henderson, J. T., A. L. Chopko y P. D. D. v. Wassenaar.** 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch. Biochem. Biophys.*, 295: 5–12.
- Hessen, D. O. y T. Andersen.** 1990. Bacteria as a source of phosphorus for zooplankton. *Hydrobiologia*, 206: 217–223.
- Hickey, R. M., D. P. Twomey, R. P. Ross y C. Hill.** 2003. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology*, 149: 655–664.
- Hidalgo, M. C., A. Skalli, E. AbellÁN, M. Arizcun y G. Cardenete.** 2006. Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex* L.): effects on growth performance, survival and liver proteolytic activities. *Aquacult. Nutr.*, 12: 256–266.
- Hijano Baola, A., P. C. Freire, J. C. E. Muñoz y C. García de la Rasilla Cooper.** 2005. Sospecha de escombroidosis. *SEMERGEN*, 31: 329–330.
- Hill, C. y T. O’Keeffe.** 2003. Bacteriocins. En: “*Encyclopedia of dairy sciences*”, pp. 129–135. Roginski, H., J. W. Fuqay y P. F. Fox (eds.). Academic Press, Bodmin, Reino Unido.

- Hjelm, M., O. Bergh, A. Riaza, J. Nielsen, J. Melchiorson, S. Jensen, H. Duncan, P. Ahrens, H. Birkbeck y L. Gram.** 2004. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27: 360–371.
- Holzappel, W. H. y U. Schillinger.** 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.*, 35: 109–116.
- Holzappel, W. H., R. Geisen y U. Schillinger.** 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, 24: 343–362.
- Holzappel, W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger y J. H. H. i. t. Veld.** 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 41: 85–101.
- Hoseinifar, S. H., A. Mirvaghefi y D. L. Merrifield.** 2011. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture*, 318: 90–94.
- Hosseini, S. V., S. Arlindo, K. Böhme, C. Fernández-No, P. Calo-Mata y J. Barros-Velázquez.** 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *J. Appl. Microbiol.*, 107: 1392–1403.
- Huey, B. y J. Hall.** 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.*, 171: 2528–2532.
- Hugas, M.** 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.*, 49: S139–S150.
- Hugenholtz, J., W. Sybesma, M. N. Groot, W. Wisselink, V. Ladero, K. Burgess, D. v. Sinderen, J. C. Piard, G. Eggink, E. J. Smid, G. Savoy, F. Sesma, T. Jansen, P. Hols y M. Kleerebezem.** 2002. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *A. Van Leeuw.*, 82: 217–235.
- Hummel, A. S., C. Hertel, W. H. Holzappel y C. M. A. P. Franz.** 2007a. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 730–739.
- Hummel, A. S., W. H. Holzappel y C. M. A. P. Franz.** 2007b. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.*, 30: 1–7.
- Hunter, P. R. y M. A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 2465–2466.
- Huys, G., K. D'Haene, M. Cnockaert, L. Tosi, M. Danielsen, A. B. Flórez, J. Matto, L. Axelsson, J. Korhonen, S. Mayrhofer, M. Egervärn, M. Giacomini y P. Vandamme.** 2011. Intra- and interlaboratory performances of two commercial antimicrobial susceptibility testing methods for bifidobacteria and nonenterococcal lactic acid bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54: 2567–2574.
- Huys, L., P. Dhert, R. Robles, F. Ollevier, P. Sorgeloos y J. Swings.** 2001. Search for beneficial bacterial strains for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larviculture. *Aquaculture*, 193: 25–37.
- Ibnou-Zekri, N., S. Blum, E. J. Schiffrin y T. von der Weid.** 2003. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties *in vitro*. *Infect. Immun.*, 71: 428–436.
- Imbeault, S., S. Parent, M. Lagacé, C. F. Uhland y J.-F. o. Blais.** 2006. Using bacteriophages to prevent furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in farmed brook trout. *J. Aquat. Anim. Health*, 18: 203–214.
- Intriago, P. y D. A. Jones.** 1993. Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture*, 113: 115–127.

- Irianto, A. y B. Austin.** 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 25: 333–342.
- Irianto, A. y B. Austin.** 2003. Use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 26: 59–62.
- Ishida, Y., A. M. Ahmed, N. B. Mahfouz, T. Kimura, S. A. El-Khodery, A. A. Moawad y T. Shimamoto.** 2010. Molecular analysis of antimicrobial resistance in gram-negative bacteria isolated from fish farms in Egypt. *J. Vet. Med. Sci.*, 72: 727–734.
- Iwen, P. C., C. Mindru, A. C. Kalil y D. F. Florescu.** 2012. *Pediococcus acidilactici* endocarditis successfully treated with daptomycin. *J. Clin. Microbiol.*, 50: 1106–1108.
- Jack, R. W., J. R. Tagg y B. Ray.** 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59: 171–200.
- Jespersen, L. y M. Jakobsen.** 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 139–155.
- Jiang, F., Y. Zhang y G. J. Dusting.** 2011. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol. Rev.*, 63: 218–242.
- Jiménez-Díaz, R., J. L. Ruiz-Barba, D. P. Cathcart, H. Holo, I. F. Nes, K. H. Sletten y P. J. Warner.** 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 4459–4463.
- Jöborn, A., J. C. Olsson, A. Westerdahl, P. L. Conway y S. Kjelleberg.** 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K1. *J. Fish Dis.*, 20: 383–392.
- Joerger, R. D., D. G. Hoover, S. F. Barefoot, K. M. Harmon, D. A. Grinstead y C. G. Nettles-Cutter.** 2000. Bacteriocins. En: “*Encyclopedia of Microbiology*”, pp. 383–397, 2ª edición. Lederberg, J. (ed.). Academic Press, San Diego, CA, EE.UU.
- Joffraud, J. J., F. Leroi, C. Roy y J. L. Berdagué.** 2001. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiol.*, 66: 175–184.
- Jun, L. J., J. H. Kim, J. W. Jin y H. D. Jeong.** 2012. Characterization of a new beta-lactamase gene from isolates of *Vibrio* spp. in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 22: 555–562.
- Jung, M. K., S. H. Ahn, W. G. Lee y E. H. Lee.** 2014. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci isolated from non-tertiary-care and tertiary-care hospitals in Korea. *Epidemiol. Infect.*, 142: 2372–2377.
- Juntunen, M., P. V. Kirjavainen, A. C. Ouwehand, S. J. Salminen y E. Isolauri.** 2001. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8: 293–296.
- Jurkovič, D., L. Križková, M. Sojka, M. Takáčová, R. Dušínský, J. Krajčovič, P. Vandamme y M. Vancanneyt.** 2007. Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 116: 82–87.
- Kalliomaki, M., S. Salminen y E. Isolauri.** 2008. Positive interactions with the microbiota: probiotics. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 635: 57–66.
- Karunasagar, I., R. Pai, G. R. Malathi y I. Karunasagar.** 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture*, 128: 203–209.

- Kassahn, K. S., V. T. Dang, S. J. Wilkins, A. C. Perkins y M. A. Ragan.** 2009. Evolution of gene function and regulatory control after whole-genome duplication: comparative analyses in vertebrates. *Genome Res.*, 19: 1404–1418.
- Kawai, Y., R. Kemperman, J. Kok y T. Saito.** 2004. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 5: 393–398.
- Kayser, F. H.** 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 255–262.
- Kelly, W. J., L. J. Ward y S. C. Leahy.** 2010. Chromosomal diversity in *Lactococcus lactis* and the origin of dairy starter cultures. *Genome Biol. Evol.*, 2: 729–744.
- Kemperman, R., A. Kuipers, H. Karsens, A. Nauta, O. Kuipers y J. Kok.** 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A y closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1589–1597.
- Kennedy, S. B., J. W. Tucker, C. L. Neidig, G. K. Vermeer, V. R. Cooper, J. L. Jarrell y D. G. Sennett.** 1998. Bacterial management strategies for stock enhancement of warm water marine fish: a case study with common snook (*Centropomus undecimalis*). *B. Mar. Sci.*, 62: 573–588.
- Kepka, M., B. M. L. Verburg-van Kemenade, J. Homa y M. Chadzinska.** 2014. Mechanisms involved in apoptosis of carp leukocytes upon *in vitro* and *in vivo* immunostimulation. *Fish Shellfish Immunol.*, 39: 386–395.
- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M. J. Lategan y L. Gibson.** 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1–14.
- Kim, D. H. y B. Austin.** 2006a. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol.*, 21: 513–524.
- Kim, D. H. y B. Austin.** 2006b. Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, induced by probiotics. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 114: 297–304.
- Kim, J.-S., R. Harikrishnan, M.-C. Kim, C. Balasundaram y M.-S. Heo.** 2010. Dietary administration of *Zooshikella* sp. enhance the innate immune response and disease resistance of *Paralichthys olivaceus* against *Sreptococcus iniae*. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 104–110.
- Kirkup, B. C.** 2006. Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: theoretical considerations, applied research, and practical applications. *Curr. Med. Chem.*, 13: 3335–3350.
- Kjos, M., J. Borrero, M. Opsata, D. J. Birri, H. Holo, L. M. Cintas, L. Snipen, P. E. Hernández, I. F. Nes y D. B. Diep.** 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157: 3256–3267.
- Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 39–86.
- Klare, I., G. Werner y W. Witte.** 2001. Enterococci: habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. En: “*Emerging bacterial pathogens. Contrib. Microbiol. vol. 8*”, pp. 108–122. Mühldofer, I. y K. P. Schäfer (eds.). Basel/Karger, Suiza.
- Klare, I., C. Konstabel, D. Badstübner, G. Werner y W. Witte.** 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 269–290.
- Klare, I., C. Konstabel, S. Mueller-Bertling, G. Werner, B. Strommenger, C. Kettlitz, S. Borgmann, B. Schulte, D. Jonas, A. Serr, A. M. Fahr, U. Eigner y W. Witte.** 2005a. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 24: 815–825.

- Klare, I., C. Konstabel, S. Müller-Bertling, R. Reissbrodt, G. Huys, M. Vancanneyt, J. Swings, H. Goossens y W. Witte.** 2005b. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and *Bifidobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 8982–8986.
- Klare, I., C. Konstabel, G. Werner, G. Huys, V. Vankerckhoven, G. Kahlmeter, B. Hildebrandt, S. Müller-Bertling, W. Witte y H. Goossens.** 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59: 900–912.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte y G. Reuter.** 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 41: 103–125.
- Klein, G., C. Hallmann, I. A. Casas, J. Abad, J. Louwers y G. Reuter.** 2000. Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 815–824.
- Knerr, P. J. y W. A. van de Donk.** 2012. Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annu. Rev. Biochem.*, 81: 479–505.
- Koch, S., M. Hufnagel, C. Theilacker y J. Huebner.** 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*, 22: 822–830.
- Kocher, A.** 2004. The potential for immunosaccharides to maximise growth performance – A review of six published meta-analyses on Bio-Mos. En: “*Interfacing immunity, gut health and performance*”, pp. 107–116. Tucker, L. A., J. A. Taylor-Pickard (eds.). Nottingham University Press, Nottingham, Reino Unido.
- Köllner, B., B. Wasserrab, G. Kotterba y U. Fischer.** 2002. Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)-how can environmental influences be detected? *Toxicol. Lett.*, 131: 83–95.
- Kullen, M. J., R. B. Sanozky-Dawes, D. C. Crowell y T. R. Klaenhammer.** 2000. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 511–516.
- Kumar, R., S. C. Mukherjee, R. Ranjan y S. K. Nayak.** 2008. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish Shellfish Immunol*, 24: 168–172.
- Ladero, V., M. Fernández y M. A. Álvarez.** 2009. Isolation and identification of tyramine-producing enterococci from human fecal samples. *Can. J. Microbiol.*, 55: 215–218.
- Ladero, V., M. Calles-Enríquez, M. Fernández y M. A. Álvarez.** 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr. Nutr. Food Sci.*, 6: 145–156.
- Ladero, V., M. Fernández, M. Calles-Enríquez, E. Sánchez-Llana, E. Canedo, M. C. Martín y M. A. Álvarez.** 2012. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiol.*, 30: 132–138.
- Lamari, F., K. Sadok, A. Bakhrouf y F.-J. Gatesoupe.** 2014. Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and *in vivo* test on *Artemia* nauplii. *Aquacult. Int.*, 22: 699–709.
- Lan, M. Z., X. Peng, M. Y. Xiang, Z. Y. Xia, W. Bo, L. Jie, X. Y. Li y Z. P. Jun.** 2007. Construction and characterization of a live, attenuated *esrB* mutant of *Edwardsiella tarda* and its

potential as a vaccine against the haemorrhagic septicaemia in turbot, *Scophthamus maximus* (L.). *Fish Shellfish Immunol*, 23: 521–530.

Landete, J. M., B. de Las Rivas, A. Marcobal y R. Muñoz. 2007. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *Int. J Food Microbiol.*, 117: 258–269.

Lara-Flores, M., M. A. Olvera-Novoa, B. Guzmán-Méndez, E. y W. López-Madrid. 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216: 193–201.

Lategan, M. J., F. R. Torpy y L. F. Gibson. 2004. Control of saprolegniosis in the eel *Anguilla australis* Richardson, by *Aeromonas media* strain A199. *Aquaculture*, 240: 19–27.

Latorre-Moratalla, M. L., S. Bover-Cid, R. Talon, T. Aymerich, M. Garriga, E. Zanardi, A. Ianieri, M. J. Fraqueza, M. Elias, E. H. Drosinos, A. Lauková y M. C. Vidal-Carou. 2010. Distribution of aminogenic activity among potential autochthonous starter cultures for dry fermented sausages. *J. Food Prot.*, 73: 524–528.

Lauková, A. 2012. Potential applications of probiotic, bacteriocin-producing enterococci and their bacteriocins. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 39–61, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds.). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.

Lauzon, H. L. 2010. Preventive measures in aquaculture isolation, application and effects of probiotics on Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) rearing at early stages. Tesis doctoral. Universidad de Islandia, Islandia.

Lavens, P. y P. Sorgeloos. 2000. The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*, 181: 397–403.

Lawton, E. M., R. P. Ross, C. Hill y P. D. Cotter. 2007. Two-peptide lantibiotics: a medical perspective. *Mini Rev. Med. Chem.*, 7: 1236–1247.

Lazado, C. C. y C. M. A. Caipang. 2014a. Probiotics-pathogen interactions elicit differential regulation of cutaneous immune responses in epidermal cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Fish Shellfish Immunol.*, 36: 113–119.

Lazado, C. C. y C. M. A. Caipang. 2014b. Bacterial viability differentially influences the immunomodulatory capabilities of potential host-derived probiotics in the intestinal epithelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. *J. Appl. Microbiol.*, 116: 990–998.

Lazado, C. C. y C. M. A. Caipang. 2014c. Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 39: 78–89.

Lazado, C. C., C. M. Caipang, M. F. Brinchmann y V. Kiron. 2011. *In vitro* adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. *Vet. Microbiol.*, 148: 252–259.

Le Jeune, C., A. Lonvaud-Funel, B. ten Brink, H. Hofstra y J. M. van der Vossen. 1995. Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 316–326.

Leavis, H. L., R. J. Willems, J. Top, E. Spalburg, E. M. Mascini, A. C. Fluit, A. Hoepelman, A. J. de Neeling y M. J. Bonten. 2003. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 1108–1115.

- Leavis, H. L., J. Top, N. Shankar, K. Borgen, M. Bonten, J. van Embden y R. J. Willems.** 2004. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J. Bacteriol.*, 186: 672–682.
- Leavis, H. L., R. J. Willems, W. J. van Wamel, F. H. Schuren, M. P. Caspers y M. J. Bonten.** 2007. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathog.*, 3: e7.
- Leclercq, R.** 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.*, 34: 482–492.
- Leendertse, M., E. Heikens, L. M. Wijnands, M. van Luit-Asbroek, G. J. Teske, J. J. Roelofs, M. J. Bonten, T. van der Poll y R. J. Willems.** 2009. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice. *J. Infect. Dis.*, 200: 1162–1165.
- Léger, P., D. A. Bengtson, P. Sorgeloos, K. L. Simpson y A. D. Beck.** 1987. The nutritional value of Artemia : a review. Artemia Research and its Applications. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in aquaculture. P. Sorgeloos, D. A. Bengtson, W. Decleir y E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium. 556 p.
- Lehane, L. y J. Olley.** 2000. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.*, 58: 1–37.
- Leiro, J., M. Ortega, J. Estévez, F. M. Ubeira y M. L. Sanmartín.** 1996. The role of opsonization by antibody and complement in *in vitro* phagocytosis of microsporidian parasites by turbot spleen cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 51: 201–210.
- Leroy, F. y L. d. Vuyst.** 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.*, 15: 67–78.
- Leroy, F., J. Verluyten y L. d. Vuyst.** 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, 106: 270–285.
- Li, J., D. R. Barreda, Y. A. Zhang, H. Boshra, A. E. Gelman, S. Lapatra, L. Tort y J. O. Sunyer.** 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nat. Immunol.*, 7: 1116–1124.
- Lina, G., A. Quaglia, M. E. Reverdy, R. Leclercq, F. Vandenesch y J. Etienne.** 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 1062–1066.
- Lindsay, G. J. H.** 1986. The significance of chitinolytic enzymes and lysozyme in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) defence. *Aquaculture*, 51: 169–173.
- Liu, C. H., C. H. Chiu, S. W. Wang y W. Cheng.** 2012. Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol.*, 33: 699–706.
- Liu, C. S., Y. Sun, Y. H. Hu y L. Sun.** 2010. Identification and analysis of a CpG motif that protects turbot (*Scophthalmus maximus*) against bacterial challenge and enhances vaccine-induced specific immunity. *Vaccine*, 28: 4153–4161.
- Ljungh, A. y T. Wadström.** 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 7: 73–89.
- López, M., Y. Sáenz, B. Rojo-Bezares, S. Martínez, R. del Campo, F. Ruiz-Larrea, M. Zarazaga y C. Torres.** 2009. Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int. J. Food Microbiol.*, 133: 172–178.

- Lucas, P., J. Landete, M. Coton, E. Coton y A. Lonvaud-Funel.** 2003. The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 229: 65–71.
- Lücke, F.-K.** 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.*, 56: 105–115.
- Lunestad, B. T., L. Nesse, J. Lassen, B. Svihus, T. Nesbakken, K. Fossum, J. T. Rosnes, H. Kruse y S. Yazdankhah.** 2007. Salmonella in fish feed; occurrence and implications for fish and human health in Norway. *Aquaculture*, 265: 1–8.
- Lyhs, U. y J. Björkroth.** 2008. *Lactobacillus sakei/curvatus* is the prevailing lactic acid bacterium group in spoiled maatjes herring. *Food Microbiol.*, 25: 529–533.
- Lyhs, U., H. Korkeala, P. Vandamme y J. Björkroth.** 2001. *Lactobacillus alimentarius*—a specific spoilage organism in marinated herring. *Int. J. Food Microbiol.*, 64: 355–360.
- Lyra, A., S. Lahtinen y A. C. Ouwehand.** 2012. Gastrointestinal benefits of probiotics—clinical evidence. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 509–524, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds.). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Macpherson, H. L., O. Bergh y T. H. Birkbeck.** 2012. An aerolysin-like enterotoxin from *Vibrio splendidus* may be involved in intestinal tract damage and mortalities in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and cod, *Gadus morhua* L., larvae. *J. Fish Dis.*, 35: 153–167.
- Maeda, M., A. Shibata, G. Biswas, H. Korenaga, T. Kono, T. Itami y M. Sakai.** 2014. Isolation of Lactic Acid Bacteria from Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory role of a selected strain as probiotic. *Mar. Biotechnol.*, 16: 181–192.
- Mahious, A. S., J. Gatesoupe, M. Hervy, R. Metailler y F. Ollevier.** 2006. Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquacult. Int.*, 14: 219–229.
- Maischberger, T., I. Mierau, C. K. Peterbauer, J. Hugenholtz y D. Haltrich.** 2010. High-level expression of *Lactobacillus* beta-galactosidases in *Lactococcus lactis* using the food-grade, nisin-controlled expression system NICE. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 2279–2287.
- Majhenič, A. Č., I. Rogelf y B. Perko.** 2005. Enterococci from Tolminc cheese: population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *Int. J. Food. Microbiol.*, 102: 239–244.
- Makridis, P., A. Jon Fjellheim, J. Skjermo y O. Vadstein.** 2000. Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers. *Aquacult. Int.*, 8: 367–380.
- Makridis, P., S. Martins, T. Vercauteren, K. Van Driessche, O. Decamp y M. T. Dinis.** 2005. Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an *in vivo* approach. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40: 274–277.
- Maqueda, M., A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, M. J. Sánchez-Barrena, C. González, A. Albert, M. Rico y E. Valdivia.** 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 5: 399–416.
- Maqueda, M., M. Sánchez-Hidalgo, M. Fernández, M. Montalbán-López, E. Valdivia y M. M. Bueno.** 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 2–22.

- March, C., J. J. Manclús, A. Abad, A. Navarro y A. Montoya.** 2005. Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera. *J. Immunol. Methods*, 303: 92–104.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, J. S. Song, A. Tasneem, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang y S. H. Bryant.** 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.*, 37: D205–D210.
- Marco, M. L., S. Pavan y M. Kleerebezem.** 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17: 204–210.
- Marcobal, A., B. de las Rivas, E. García-Moruno y R. Muñoz.** 2004. The tyrosine decarboxylation test does not differentiate *Enterococcus faecalis* from *Enterococcus faecium*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27: 423–426.
- Marcobal, A., B. de las Rivas, M. V. Moreno-Arribas y R. Muñoz.** 2005. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods. *J. Food Prot.*, 68: 874–878.
- Marcobal, A., B. de las Rivas y R. Muñoz.** 2006a. First genetic characterization of a bacterial beta-phenylethylamine biosynthetic enzyme in *Enterococcus faecium* RM58. *FEMS Microbiol. Lett.*, 258: 144–149.
- Marcobal, A., P. J. Martín-Álvarez, M. V. Moreno-Arribas y R. Muñoz.** 2006b. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Res. Microbiol.*, 157: 417–424.
- Markiewicz, L. H., E. Biedrzycka, E. Wasilewska y M. Bielecka.** 2010. Rapid molecular identification and characteristics of *Lactobacillus* strains. *Folia Microbiol. (Praha)*, 55: 481–488.
- Marothi, Y. A., H. Agnihotri y D. Dubey.** 2005. Enterococcal resistance: an overview. *Indian J. Med. Microbiol.*, 23: 214–219.
- Marques, A., T. Dinh, C. Ioakeimidis, G. Huys, J. Swings, W. Verstraete, J. Dhont, P. Sorgeloos y P. Bossier.** 2005. Effects of bacteria on *Artemia franciscana* cultured in different gnotobiotic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 4307–4317.
- Marques, A., F. Ollevier, W. Verstraete, P. Sorgeloos y P. Bossier.** 2006a. Gnotobiotically grown aquatic animals: opportunities to investigate host-microbe interactions. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 903–918.
- Marques, A., T. Huynh Thanh, W. Verstraete, J. Dhont, P. Sorgeloos y P. Bossier.** 2006b. Use of selected bacteria and yeast to protect gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 334: 20–30.
- Marques, A., T. H. Thanh, P. Sorgeloos y P. Bossier.** 2006c. Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Aquaculture*, 258: 116–126.
- Marteau, P., M. F. Gerhardt, A. Myara, E. Bouvier, F. Trivin y J. C. Rambaud.** 1995. Metabolism of bile salts by alimentary bacteria during transit in the human small intestine. *Microb. Ecol. Health D.*, 8: 151–157.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2006. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of Enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.*, 69: 520–531.

- Martín-Platero, A. M., E. Valdivia, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** 2009. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, 132: 24–32.
- Martindale, J. L. y N. J. Holbrook.** 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell Physiol.*, 192: 1–15.
- Martínez Cruz, P., A. L. Ibáñez, O. A. Monroy Hermosillo y H. C. Ramírez Saad.** 2012. Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiol.*, 2012: 1–13.
- Martínez, M. I., J. M. Martínez, C. Herranz, A. M. Suárez y J. M. Rodríguez.** 2000. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. 1. Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. *Alimentaria*, 314: 59–66.
- Marugg, J. D., C. F. González, B. S. Kunka, A. M. Ledebøer, M. J. Pucci, M. Y. Toonen, S. A. Walker, L. C. M. Zoetmulder y P. A. Vandenberg.** 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2360–2367.
- Mathur, M. D., S. Vidhani y P. L. Mehndiratta.** 2003. Bacteriophage therapy: an alternative to conventional antibiotics. *J. Assoc. Physicians India*, 51: 593–596.
- Mazzoli, R., C. Lamberti, J. D. Coisson, M. Purrotti, M. Arlorio, M. G. Giuffrida, C. Giunta y E. Pessione.** 2009. Influence of ethanol, malate and arginine on histamine production of *Lactobacillus hilgardii* isolated from an Italian red wine. *Amino Acids*, 36: 81–89.
- McCabe-Sellers, B. J., C. G. Staggs y M. L. Bogle.** 2006. Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: a crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *J. Food Comp. Anal.*, 19: S58–S65.
- Merrifield, D. L., G. Bradley, R. T. M. Baker y S. J. Davies.** 2010a. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. *Aquacult. Nutr.*, 16: 496–503.
- Merrifield, D. L., A. Dimitroglou, A. Foey, S. J. Davies, R. T. M. Baker, J. Børgwald, M. Castex y E. Ringø.** 2010b. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302: 1–18.
- Merrifield, D. L., G. Bradley, G. M. Harper, R. T. M. Baker, C. B. Munn y S. J. Davies.** 2011. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquacult. Nutr.*, 17: 73–79.
- Michel, C., C. Pelletier, M. Boussaha, D. G. Douet, A. Lautraite y P. Tailliez.** 2007. Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73: 2947–2955.
- Miller, W. L. y G. Reid.** 2012. Human studies on probiotics and endogenous lactic acid bacteria in the urogenital tract. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 543–560, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds.). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Millette, M., G. Cornut, C. Dupont, F. Shareck, D. Archambault y M. Lacroix.** 2008. Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 1997–2003.

- Miranda, C. D., C. Kehrenberg, C. Ulep, S. Schwarz y M. C. Roberts. 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 883–888.
- Mofredj, A., H. Bahloul y C. Chanut. 2007. *Lactococcus lactis*: an opportunistic bacterium? *Med. Mal. Infect.*, 37: 200–207.
- Morello, E., L. G. Bermúdez-Humarán, D. Llull, V. Solé, N. Miraglio, P. Langella y I. Poquet. 2008. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 48–58.
- Morgan, M. J., Y. S. Kim y Z. Liu. 2007. Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death. *Antioxid. Redox Signal.*, 9: 1471–1483.
- Moriarty, D. J. W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164: 351–358.
- Moriñigo, M. A., J. L. Romalde, M. Chabrillón, B. Magariños, S. Arijo, M. C. Balebona y A. E. Toranzo. 2002. Effectiveness of a divalent vaccine for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) against *Vibrio alginolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 22: 298–303.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55–63.
- Mouriño, J. L. P., F. Do Nascimento Vieira, A. B. Jatobá, B. C. Da Silva, G. F. A. Jesus, W. Q. Seiffert y M. L. Martins. 2012. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma* sp.). *Aquacult. Nutr.*, 18: 73–80.
- Mulder, I. E., S. Wadsworth y C. J. Secombes. 2007. Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.*, 23: 747–759.
- Muñoz-Atienza, E. 2009. Evaluación de la seguridad de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen acuático para su empleo como probióticos y biocontroladores en la acuicultura. Trabajo Fin de Máster. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Muñoz-Atienza, E., G. Landeta, B. de las Rivas, B. Gómez-Sala, R. Muñoz, P. E. Hernández, L. M. Cintas y C. Herranz. 2011. Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.*, 146: 212–216.
- Muñoz-Atienza, E., B. Gómez-Sala, C. Araújo, C. Campanero, R. del Campo, P. E. Hernández, C. Herranz y L. M. Cintas. 2013a. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol.*, 13: 15.
- Muñoz-Atienza, E., N. Lluch, C. Araújo, P. E. Hernández, C. Herranz, L. M. Cintas y S. Magadán. 2013b. Effects of live and heat-inactivated lactic acid bacteria on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 34: 1726–1727.
- Muñoz-Atienza, E., C. Araújo, S. Magadán, P. E. Hernández, C. Herranz, Y. Santos y L. M. Cintas. 2014. *In vitro* and *in vivo* evaluation of lactic acid bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming. *Fish Shellfish Immunol.*, 41: 570–580.

- Muñoz-Atienza, E., C. Araújo, N. Lluch, P. E. Hernández, C. Herranz, L. M. Cintas y S. Magadán.** 2015. Different impact of heat-inactivated and viable lactic acid bacteria of aquatic origin on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) head-kidney leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 44: 214–223.
- Murillo, I. y L. Villamil.** 2011. *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* used as probiotics in rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultures. *J. Aquac. Res. Development*, S1:007.
- Nagao, J., S. M. Asaduzzaman, Y. Aso, K. Okuda, J. Nakayama y K. Sonomoto.** 2006. Lantibiotics: insight and foresight for the new paradigm. *J. Biosci. Bioeng.*, 102: 139–149.
- Nakai, T. y S. C. Park.** 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.*, 153: 13–18.
- Nakai, T., R. Sugimoto, K. H. Park, S. Matsuoka, K. Mori, T. Nishioka y K. Maruyama.** 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Dis. Aquat. Organ.*, 37: 33–41.
- Natrah, F. M., T. Defoirdt, P. Sorgeloos y P. Bossier.** 2011. Disruption of bacterial cell-to cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture. *Mar. Biotechnol.*, 13: 109–126.
- Nayak, S. K.** 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 2–14.
- Neefjes, J., M. L. Jongsma, P. Paul y O. Bakke.** 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.*, 11: 823–836.
- Nes, I. F. y H. Holo.** 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (Pept. Sci.)*, 55: 50–61.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havårstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink y H. Holo.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *A. Van Leeuw.*, 70: 113–128.
- Nes, I. F., H. Holo, G. Fimland, H. H. Hauge y J. Nissen-Meyer.** 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. En: “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”, pp. 81–115. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Nes, I. F., D. B. Diep y H. Holo.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.*, 189: 1189–1198.
- Nes, I. F., M. Kjos y D. B. Diep.** 2012. Antimicrobial components of lactic acid bacteria. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 285–329, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds.). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Newaj-Fyzul, A., A. H. Al-Harbi y B. Austin.** 2014. Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431: 1–11.
- Nguyen, T. D. T., J. H. Kang y M. S. Lee.** 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol.*, 113: 358–361.
- Ni, P. P., Y. Wang y P. M. Allen.** 2014. Both positive and negative effects on immune responses by expression of a second class II MHC molecule. *Mol. Immunol.*, 62: 199–208.
- Nikoskelainen, S., S. Salminen, G. Bylund y A. C. Ouwehand.** 2001a. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2430–2435.

- Nikoskelainen, S., A. Ouwehand, S. Salminen y G. Bylund.** 2001b. Protection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, 198: 229–236.
- Nikoskelainen, S., A. C. Ouwehand, G. Bylund, S. Salminen y E. M. Lilius.** 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 15: 443–452.
- Nishie, M., J.-I. Nagao y K. Sonomoto.** 2012. Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.*, 17: 1–16.
- Nissen-Meyer, J., P. Rogne, C. Oppegård, H. S. Haugen y P. E. Kristiansen.** 2009. Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 10: 19–37.
- Nissen-Meyer, J., C. Oppegård, P. Rogne, H. S. Haugen y P. E. Kristiansen.** 2010. Structure and mode of action of the two-peptide (Class IIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 2: 52–60.
- Noguchi, N., H. Nakaminami, K. Nakase y M. Sasatsu.** 2011. Characterization of *Enterococcus* strains contained in probiotic products. *Biol. Pharm. Bull.*, 34: 1469–1473.
- Noriega, L., I. Cuevas, A. Margolles y C. G. de los Reyes-Gavilán.** 2006. Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile. *Int. Dairy J.*, 16: 850–855.
- O'Shea, E. F., P. D. Cotter, C. Stanton, R. P. Ross y C. Hill.** 2012. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int. J. Food Microbiol.*, 152: 189–205.
- O'Keeffe, T. y C. Hill.** 2000. Bacteriocins. En: “*Encyclopedia of food microbiology*”, pp. 183–191. Robinson, R. K., C. A. Batt y P. D. Patel (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- O'Sullivan, L., R. P. Ross y C. Hill.** 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84: 593–604.
- Ogier, J. C. y P. Serror.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 291–301.
- Ogier, J. C., E. Casalta, C. Farrokh y A. Saïhi.** 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 126: 286–290.
- Olafsen, J. A.** 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, 200: 223–247.
- Olmos, J., L. Ochoa, J. Paniagua-Michel y R. Contreras.** 2011. Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fish meal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and *Bacillus* probiotic strains. *Mar. Drugs*, 9: 1119–1132.
- Oppegård, C., P. R. Linda-Emanuelson, P. E. Kristiansen, G. Fimland y J. Nissen-Meyer.** 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13: 210–219.
- Orozco-Medina, C., A. M. Maeda-Martínez y A. López-Cortés.** 2002. Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquaculture*, 213: 15–29.
- Orozova, P., V. Chikova y H. Najdenski.** 2010. Antibiotic resistance of pathogenic for fish isolates of *Aeromonas* spp. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 16: 376–386.

- Ortuño, J., A. Cuesta, A. Rodríguez, M. A. Esteban y J. Meseguer.** 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 85: 41–50.
- Oscáriz, J. C. y A. G. Pisabarro.** 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol.*, 4: 13–19.
- Ouwehand, A. C.** 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: “*Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*”, pp. 139–160, 2ª edición. Salminen, S. y A. von Wright (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Padrós, F. y M. D. Furones.** 2002. Patología bacteriana en piscicultura. *Actualidad SEM*, 34: 13–21.
- Padrós, F., C. Zarza, L. Dopazo, M. Cuadrado y S. Crespo.** 2006. Pathology of *Edwardsiella tarda* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis.*, 29: 87–94.
- Pag, U. y H.-G. Sahl.** 2002. Lanthionine-containing bacterial peptides. En: “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”, pp. 47–80. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Panigrahi, A. y I. S. Azad.** 2007. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiol. Biochem.*, 33: 429–440.
- Panigrahi, A., V. Kiron, T. Kobayashi, J. Puangkaew, S. Satoh y H. Sugita.** 2004. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 102: 379–388.
- Panigrahi, A., V. Kiron, J. Puangkaew, T. Kobayashi, S. Satoh y H. Sugita.** 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243: 241–254.
- Panigrahi, A., V. Kiron, S. Satoh, I. Hirono, T. Kobayashi, H. Sugita, J. Puangkaew y T. Aoki.** 2007. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev. Comp. Immunol.*, 31: 372–382.
- Panigrahi, A., V. Kiron, S. Satoh y T. Watanabe.** 2010. Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Physiol. Biochem.*, 36: 969–977.
- Panigrahi, A., K. Viswanath y S. Satoh.** 2011. Real-time quantification of the immune gene expression in rainbow trout fed different forms of probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquac. Res.*, 42: 906–917.
- Papandroulakis, N., P. Divanach, P. Anastasiadis y M. Kentouri.** 2001. The pseudo-green water technique for intensive rearing of sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquacult. Int.*, 9: 205–216.
- Park, K.-Y. y B. K. Kim.** 2012. Lactic Acid Bacteria in vegetable fermentations. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 187–211, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds.). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Park, S., T. Aoki y T. Jung.** 2012. Pathogenesis of and strategies for preventing *Edwardsiella tarda* infection in fish. *Vet. Res.*, 43: 67.
- Patra, S. K. y K. S. Mohamed.** 2003. Enrichment of *Artemia* nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquacult. Int.*, 11: 505–514.
- Pavia, M., C. G. Nobile, L. Salpietro y I. F. Angelillo.** 2000. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J. Food Prot.*, 63: 912–915.

- Peddie, S., J. Zou y C. J. Secombes.** 2002. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 86: 101–113.
- Pérez-Sánchez, T., J. L. Balcázar, Y. García, N. Halaihel, D. Vendrell, I. de Blas, D. L. Merrifield y I. Ruiz-Zarzuela.** 2011a. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.*, 34: 499–507.
- Pérez-Sánchez, T., J. L. Balcázar, D. L. Merrifield, O. Carnevali, G. Gioacchini, I. de Blas y I. Ruiz-Zarzuela.** 2011b. Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 31: 196–201.
- Pérez-Sánchez, T., I. Ruiz-Zarzuela, I. de Blas y J. L. Balcázar.** 2014. Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Rev. Aquaculture*, 6: 133–146.
- Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29: e45.
- Phuoc, L. H., M. Corteel, H. J. Nauwynck, M. B. Pensaert, V. Alday-Sanz, W. Van den Broeck, P. Sorgeloos y P. Bossier.** 2008. Increased susceptibility of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio campbellii*. *Environ. Microbiol.*, 10: 2718–2727.
- Piard, J. C. y M. Desmazeaud.** 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71: 525–541.
- Piard, J. C. y M. Desmazeaud.** 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, 72: 113–142.
- Picchietti, S., A. M. Fausto, E. Randelli, O. Carnevali, A. R. Taddei, F. Buonocore, G. Scapigliati y L. Abelli.** 2009. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 26: 368–376.
- Pirarat, N., K. Pinpimai, M. Endo, T. Katagiri, A. Ponpornpisit, N. Chansue y M. Maita.** 2011. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Res Vet Sci*, 91: e92–e97.
- Piuri, M., C. Sanchez-Rivas y S. M. Ruzal.** 2005. Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 84–95.
- Planas, M., J. A. Vázquez, J. Marqués, R. Pérez-Lomba, M. P. González y M. Murado.** 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture*, 240: 313–329.
- Planas, M., M. Pérez-Lorenzo, M. Hjelm, L. Gram, I. Uglenes Fiksdal, Ø. Bergh y J. Pintado.** 2006. Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture*, 255: 323–333.
- Pot, B., W. Ludwig, K. Kersters y K. H. Schleifer.** 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria. En: “*Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: microbiology, genetics and applications*”, pp. 13–90. de Vuyst L. y E. J. Vandamme (eds). Blackie Academic & Professional, Reino Unido.
- Pouwels, P. H., R. J. Leer, M. Shaw, M.-J. H. d. Bak-Glashouwer, F. D. Tielen, E. Smit, B. Martínez, J. Jore y P. L. Conway.** 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int. J. Food Microbiol.*, 41: 155–167.

- Poyart, C., G. Quesnes y P. Trieu-Cuot.** 2000. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 415–418.
- Prasad, J., H. Gill, J. Smart y P. K. Gopal.** 1998. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.*, 8: 993–1002.
- Pridgeon, J. W., C. A. Shoemaker y P. H. Klesius.** 2010. Identification and expression profile of multiple genes in the anterior kidney of channel catfish induced by modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 134: 184–198.
- Quinn, M. T., M. C. Ammons y F. R. Deleo.** 2006. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. *Clin. Sci. (Lond)*., 111: 1–20.
- Rabanal, H. R.** 1988. History of aquaculture. ASEAN/UNDP/FAO Regional Small-Scale Coastal Fisheries Development Project. ASEAN/SF/88/Tech. 7, 17 p. Filipinas.
- Ramírez, R. F. y B. A. Dixon.** 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture*, 227: 417–426.
- Rao, A. V., A. C. Bested, T. M. Beaulne, M. A. Katzman, C. Iorio, J. M. Berardi y A. C. Logan.** 2009. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of a probiotic in emotional symptoms of chronic fatigue syndrome. *Gut Pathog.*, 1: 6.
- Rasch, M., C. Buch, B. Austin, W. J. Slierendrecht, K. S. Ekmann, J. L. Larsen, C. Johansen, K. Riedel, L. Eberl, M. Givskov y L. Gram.** 2004. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortalities caused by Vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Syst. Appl. Microbiol.*, 27: 350–359.
- Rengpipata, S., S. Rukpratanpornb, S. Piyatiratitivorakulc y P. Menasavetab.** 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191: 271–288.
- Reyes-Becerril, M., I. Salinas, A. Cuesta, J. Meseguer, D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle y M. A. Esteban.** 2008a. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 731–739.
- Reyes-Becerril, M., D. Tovar-Ramírez, F. Ascencio-Valle, R. Civera-Cerecedo, V. Gracia-López y V. Barbosa-Solomieu.** 2008b. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*, 280: 39–44.
- Rice, L. B., L. Carias, S. Rudin, C. Vael, H. Goossens, C. Konstabel, I. Klare, S. R. Nallapareddy, W. Huang y B. E. Murray.** 2003. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J. Infect. Dis.*, 187: 508–512.
- Rice, L. B., V. Laktičová, L. L. Carias, S. Rudin, R. Hutton y S. H. Marshall.** 2009. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. *J. Infect. Dis.*, 199: 342–349.
- Rico-Mora, R., D. Voltolina y J. A. Villaescusa-Celaya.** 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (*Bacillariophyceae*) cultures. *Aquacult. Eng.*, 19: 1–6.
- Ringø, E. y F. J. Gatesoupe.** 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160: 177–203.
- Ringø, E. y W. Holzapfel.** 2000. Identification and characterization of carnobacteria associated with the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst. Appl. Microbiol.*, 23: 523–527.

- Ringø, E., E. Strom y J. A. Tabachek.** 1995. Intestinal microflora of salmonids: a review. *Aquac. Res.*, 26: 773–789.
- Ringø, E., H. R. Bendiksen, M. S. Wesmajervi, R. E. Olsen, P. A. Jansen y H. Mikkelsen.** 2000. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *J. Appl. Microbiol.*, 89: 317–322.
- Ringø, E., U. Schillinger y W. Holzapfel.** 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. En: “*Microbial ecology in growing animals*”, pp. 418–453. Holzapfel, W. H., P. J. Naughton, S. G. Pierzynowski, R. Zabielski y E. Salek (eds.). Elsevier Science Ltd. Publishing, Londres, Reino Unido.
- Ringø, E., L. Løvmo, M. Kristiansen, Y. Bakken, I. Salinas, R. Myklebust, R. E. Olsen y T. M. Mayhew.** 2010a. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquac. Res.*, 41: 451–467.
- Ringø, E., R. E. Olsen, T. Ø. Gifstad, R. A. Dalmo, H. Amlund, G. I. Hemre y A. M. Bakke.** 2010b. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquacult. Nutr.*, 16: 117–136.
- Ringø, E., R. Olsen, I. Jensen, J. Romero y H. L. Lauzon.** 2014. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. *Rev. Fish Biol. Fisher.*: 1–28.
- Riquelme, C., G. Hayashida, R. Araya, A. Uchida, M. Satomi y Y. Ishida.** 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *J. Shellfish Res.*, 15: 369–374.
- Roberts, M. C., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L. B. Jensen, J. Rood y H. Seppala.** 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 2823–2830.
- Robertson, P. A. W., C. O’Dowd, C. Burrells, P. Williams y B. Austin.** 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 185: 235–243.
- Rodgers, S.** 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures-a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 12: 276–284.
- Rodgers, S., K. Kailasapathy, J. Cox y P. Peiris.** 2002. Bacteriocin production by protective cultures. *Food Service Technol.*, 2: 59–68.
- Rodgers, C. J. y M. D. Furones.** 2009. Antimicrobial agents in aquaculture: practice, needs and issues. En “*The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*”, Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens, 86, pp. 41–59. Rogers, C. y B. Basurco (eds.). CIHEAM, Zaragoza, España.
- Rodríguez Gutiérrez, M., D. G. Rodríguez Cázares, Y. Monroy García y J. A. Mata Sotres.** 2001. Manual de enfermedades de peces. *Boletín del programa nacional de sanidad acuícola y la red de diagnóstico*, 3: 1–14.
- Romalde, J. L., B. Magariños y A. E. Toranzo.** 1999. Prevention of streptococosis in turbot by intraperitoneal vaccination: a review. *J. Appl. Ichthyol.*, 15: 153–158.
- Román, L., F. Real, L. Sorroza, D. Padilla, B. Acosta, V. Grasso, J. Bravo y F. Acosta.** 2012. The *in vitro* effect of probiotic *Vagococcus fluvialis* on the innate immune parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.*, 33: 1071–1075.

- Román, L., F. Real, D. Padilla, F. El Aamri, S. Déniz, V. Grasso y F. Acosta.** 2013. Cytokine expression in head-kidney leucocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after incubation with the probiotic *Vagococcus fluvialis* L-21. *Fish Shellfish Immunol.*, 35: 1329–1332.
- Romero, J., C. G. Feijoo y P. Navarrete.** 2012. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. En: “*Health and environment in aquaculture*”, pp. 159–198. Carvalho, E. D., G. Silva David, R. J. da Silva (eds.). InTech, Rijeka, Croacia.
- Romero, M., R. Avendano-Herrera, B. Magarinos, M. Camara y A. Otero.** 2010. Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group. *FEMS Microbiol. Lett.*, 304: 131–139.
- Roos, S. y H. Jonsson.** 2002. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*, 148: 433–442.
- Rosenfeld, W. D. y C. E. ZoBell.** 1947. Antibiotic production by marine microorganisms. *J. Bacteriol.*, 54: 393–398.
- Ross, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twomey, W. J. Meaney y C. Hill.** 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *A. Van Leeuw.*, 76: 337–346.
- Ross, R. P., S. Morgan y C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.*, 79: 3–16.
- Rubio, R., S. Bover-Cid, B. Martin, M. Garriga y T. Aymerich.** 2013. Assessment of safe enterococci as bioprotective cultures in low-acid fermented sausages combined with high hydrostatic pressure. *Food Microbiol.*, 33: 158–165.
- Ruiz-Moyano, S., A. Martin, M. J. Benito, E. Aranda, R. Casquete y G. Cordoba Mde.** 2009. Safety and functional aspects of preselected enterococci for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *J. Food Sci.*, 74: M398–404.
- Ruiz-Ponte, C., J. F. Samain, J. L. Sánchez y J. L. Nicolas.** 1999. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Mar. Biotechnol.*, 1: 52–59.
- Ruseler-van Embden, J. G., L. M. van Lieshout, M. J. Gosselink y P. Marteau.** 1995. Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scand. J. Gastroenterol.*, 30: 675–680.
- Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross y C. Hill.** 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2287–2290.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto y T. Mattila-Sandholm.** 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, 84: 197–215.
- Sablon, E., B. Contreras y E. Vandamme.** 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 68: 21–60.
- Saha, N. R., T. Usami y Y. Suzuki.** 2003. A double staining flow cytometric assay for the detection of steroid induced apoptotic leucocytes in common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 351–363.
- Sahl, H.-G. y G. Bierbaum.** 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52: 41–79.
- Sakai, M.** 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63–92.

- Sakamoto, K. y W. N. Konings.** 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.*, 89: 105–124.
- Salinas, I., A. Cuesta, M. A. Esteban y J. Meseguer.** 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol.*, 19: 67–77.
- Salinas, I., P. Díaz-Rosales, A. Cuesta, J. Meseguer, M. Chabrilón, M. A. Moriñigo y M. A. Esteban.** 2006. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 111: 279–286.
- Salinas, I., L. Abelli, F. Bertoni, S. Picchietti, A. Roque, D. Furones, A. Cuesta, J. Meseguer y M. A. Esteban.** 2008a. Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 25: 114–123.
- Salinas, I., J. Meseguer y M. A. Esteban.** 2008b. Antiproliferative effects and apoptosis induction by probiotic cytoplasmic extracts in fish cell lines. *Vet. Microbiol.*, 126: 287–294.
- Salminen, M. K., H. Rautelin, S. Tynkkynen, T. Poussa, M. Saxelin, V. Valtonen y A. Jarvinen.** 2006. *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clin. Infect. Dis.*, 42: e35–e44.
- Salminen, S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. d. Vos, R. Fondén, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S. E. Birkeland y T. Mattila-Sandholm.** 1998. Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 44: 93–106.
- Salovaara, H. y M. Gänzle.** 2012. Lactic acid bacteria in cereal-based products. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 227–245, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds.). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Samelis, J., A. Kakouri y J. Rementzis.** 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiol.*, 17: 329–340.
- Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2007. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food Microbiol.*, 117: 295–305.
- Sang, Y. y F. Blecha.** 2008. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim. Health Res. Rev.*, 9: 227–235.
- Santos, Y., F. Pazos y J. L. Barja.** 1999. *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. ICES Identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish. *Int. Counc. Explor. Sea*, 55: 1–6.
- Santos, Y., S. García-Márquez, P. G. Pereira, F. Pazos, A. Riaza, R. Silva, A. El Morabit y F. M. Ubeira.** 2005. Efficacy of furunculosis vaccines in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.): evaluation of immersion, oral and injection delivery. *J. Fish Dis.*, 28: 165–172.
- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy y D. Ansquer.** 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*, 191: 133–144.
- Schirrmeister, J. F., A. L. Liebenow, K. Pelz, A. Wittmer, A. Serr, E. Hellwig y A. Al-Ahmad.** 2009. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *J. Endod.*, 35: 169–174.

- Schmidt, A. S., M. S. Bruun, I. Dalsgaard, K. Pedersen y J. L. Larsen. 2000. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four danish rainbow trout farms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 4908–4915.
- Schol, U., G. G. Díaz, D. Ricque, L. E. C. Suárez, F. V. Albores y J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*, 176: 271–283.
- Schubiger, C. B., L. H. Orfe, P. S. Sudheesh, K. D. Cain, D. H. Shah y D. R. Call. 2015. Entericidin is required for a probiotic treatment (*Enterobacter* sp. strain C6-6) to protect trout from cold-water disease challenge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81: 658–665.
- Seppola, M., R. E. Olsen, E. Sandaker, P. Kanapathippillai, W. Holzapfel y E. Ringø. 2006. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing of carnobacteria isolated from hindgut chamber and large intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Syst. Appl. Microbiol.*, 29: 131–137.
- Sepulcre, M. P., E. Sarropoulou, G. Kotoulas, J. Meseguer y V. Mulero. 2007. *Vibrio anguillarum* evades the immune response of the bony fish sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) through the inhibition of leukocyte respiratory burst and down-regulation of apoptotic caspases. *Mol. Immunol.*, 44: 3751–3757.
- Sharifuzzaman, S. M. y B. Austin. 2009. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol.*, 27: 440–445.
- Sheikhzadeh, N., M. Heidarieh, A. Karimi Pashaki, K. Nofouzi, M. Ahrab Farshbafi y M. Akbari. 2012. Hilyses®, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 32: 1083–1087.
- Shelby, R. A., C. Lim, M. Yildirim-Aksoy y M. A. Delaney. 2006. Effects of probiotic diet supplements on disease resistance and immune response of young Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Appl. Aquaculture*, 18: 23–34.
- Shelby, R. A., C. Lim, M. Yildirim-Aksoy y P. H. Klesius. 2007. Effects of probiotic bacteria as dietary supplements on growth and disease resistance in young channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Appl. Aquaculture*, 19: 81–91.
- Sheldon, W. L., M. S. Macauley, E. J. Taylor, C. E. Robinson, S. J. Charnock, G. J. Davies, D. J. Voadlo y G. W. Black. 2006. Functional analysis of a group A streptococcal glycoside hydrolase Spy1600 from family 84 reveals it is a beta-N-acetylglucosaminidase and not a hyaluronidase. *Biochem. J.*, 399: 241–247.
- Sica, M. G., L. I. Brugnani, P. L. Marucci y M. A. Cubitto. 2012. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. *A. Van Leeuw.*, 101: 869–879.
- Sigh, J., T. Lindenstrom y K. Buchmann. 2004. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.*, 17: 75–86.
- Silk, D. B., A. Davis, J. Vulevic, G. Tzortzis y G. R. Gibson. 2009. Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 29: 508–518.

- Silva-Lopes, M. F., T. Ribeiro, M. Abrantes, J. J. Figueiredo-Marques, R. Tenreiro y M. T. Barreto-Crespo.** 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int. J. Food Microbiol.*, 103: 191–198.
- Silla, M. H.** 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 29: 213–231.
- Singh, A., R. V. Goering, S. Simjee, S. L. Foley y M. J. Zervos.** 2006. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 19: 512–530.
- Skaugen, M., L. M. Cintas y I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. En: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 225–260. Wood, B. J. B. y P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, NY, EE.UU.
- Smit, G., B. A. Smit y W. J. M. Engels.** 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 591–610.
- Smith, L. y J. D. Hillman.** 2008. Therapeutic potential of type A (I) lantibiotics, a group of cationic peptide antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11: 401–408.
- Sommerset, I., B. Krossoy, E. Biering y P. Frost.** 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert. Rev. Vaccines*, 4: 89–101.
- Son, V. M., C. C. Chang, M. C. Wu, Y. K. Guu, C. H. Chiu y W. Cheng.** 2009. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol.*, 26: 691–698.
- Song, S. K., B. R. Beck, D. Kim, J. Park, J. Kim, H. D. Kim y E. Ringo.** 2014. Prebiotics as immunostimulants in aquaculture: a review. *Fish Shellfish Immunol.*, 40: 40–48.
- Song, Z.-F., T.-X. Wu, L.-S. Cai, L.-J. Zhang y X.-D. Zheng.** 2006. Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 7: 596–602.
- Song, Z.-F., J. An, G. H. Fu y X. L. Yang.** 2011. Isolation and characterization of an aerobic denitrifying *Bacillus* sp. YX-6 from shrimp culture ponds. *Aquaculture*, 319: 188–193.
- Sorgeloos, P., M. Dehasque, P. Dhert y P. Lavens.** 1995. Review of some aspects of marine fish larviculture. *ICES Mar. Sci. Symp.*, 201: 138–142.
- Sorroza, L., D. Padilla, F. Acosta, L. Román, V. Grasso, J. Vega y F. Real.** 2012. Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. *Vet. Microbiol.*, 155: 369–373.
- Soto-Rodríguez, S. A., A. Roque, M. L. Lizarraga-Partida, A. L. Guerra-Flores y B. Gómez-Gil.** 2003. Virulence of luminous vibrios to *Artemia franciscana* nauplii. *Dis. Aquat. Organ.*, 53: 231–240.
- Soto-Rodríguez, S. A., N. Simoes, A. Roque y B. Gómez Gil.** 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture*, 258: 109–115.
- Spanggaard, B., I. Huber, J. Nielsen, E. B. Sick, C. B. Pipper, T. Martinussen, W. J. Slierendrecht y L. Gram.** 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environ. Microbiol.*, 3: 755–765.
- Standen, B. T., M. D. Rawling, S. J. Davies, M. Castex, A. Foey, G. Gioacchini, O. Carnevali y D. L. Merrifield.** 2013. Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 35: 1097–1104.

- Steinkraus, K. H.** 2002. Fermentations in world food processing. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 1: 23–32.
- Stiles, M. E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *A. Van Leeuw.*, 70: 331–345.
- Stiles, M. E. y W. H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.*, 36: 1–29.
- Stolaki, M., W. M. d. Vos, M. Kleerebezem y E. G. Zoetendal.** 2012. Lactic acid bacteria in the gut. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 385–401, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds.). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Ström-Bestor, M. y T. Wiklund.** 2011. Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. on *Flavobacterium psychrophilum*, *in vitro*. *J. Fish Dis.*, 34: 255–264.
- Strommenger, B., C. Kettlitz, G. Werner y W. Witte.** 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 4089–4094.
- Subasinghe, R.** 2009. Disease control in aquaculture and the responsible use of veterinary drugs and vaccines: The issues, prospects and challenges. En: “*The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*”, pp. 5–11. Rogers C. y B. Basurco (eds). Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 86. CIHEAM, Zaragoza, España.
- Sugamata, R., H. Suetake, K. Kikuchi y Y. Suzuki.** 2009. Teleost B7 expressed on monocytes regulates T cell responses. *J. Immunol.*, 182: 6799–6806.
- Sun, Y.-Z., H.-L. Yang, R.-L. Ma y W.-Y. Lin.** 2010. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 803–809.
- Sutcliffe, J., T. Grebe, A. Tait-Kamradt y L. Wondrack.** 1996a. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40: 2562–2566.
- Sutcliffe, J., A. Tait-Kamradt y L. Wondrack.** 1996b. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40: 1817–1824.
- Suzzi, G. y F. Gardini.** 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 41–54.
- Švec, P., A. Ševčíková, I. Sedláček, J. Bednářová, C. Snauwaert, K. Lefebvre, P. Vandamme y M. Vancanneyt.** 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from human blood cultures. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 49: 192–196.
- Szajewska, H.** 2012. Human studies on probiotics: infants and children. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 525–542, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds.). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Tafalla, C., J. Bøgwald y R. A. Dalmo.** 2013. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish Shellfish Immunol.*, 35: 1740–1750.
- Tamine, A. Y.** 2002. Microbiology of starter cultures. En: “*Dairy Microbiology Handbook*”, 3ª edición. Robinson, R. K. (ed.). Wiley Interscience, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.
- Taoka, Y., H. Maeda, J.-Y. Jo, M.-J. Jeon, S. C. Bai, W.-J. Lee, K. Yuge y S. Koshio.** 2006a. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Sci.*, 72: 310–321.

- Taoka, Y., H. Maeda, J.-Y. Jo, S.-M. Kim, S.-I. Park, T. Yoshikawa y T. Sakata.** 2006b. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Sci.*, 72: 755–766.
- Tarahomjoo, S.** 2012. Development of vaccine delivery vehicles based on lactic acid bacteria. *Mol. Biotechnol.*, 51: 183–199.
- Teitelbaum, J. E. y W. A. Walker.** 2002. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu. Rev. Nutr.*, 22: 107–138.
- Tejero-Sariñena, S., J. Barlow, A. Costabile, G. R. Gibson y I. Rowland.** 2012. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18: 530–538.
- ten Brink, B., C. Damink, H. M. Joosten y J. H. Huis in 't Veld.** 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 11: 73–84.
- Teo, J. W., A. Suwanto y C. L. Poh.** 2000. Novel beta-lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 1309–1314.
- Thibodeaux, L. K., K. G. Burnett y L. E. Burnett.** 2009. Energy metabolism and metabolic depression during exercise in *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: effects of the bacterial pathogen *Vibrio campbellii*. *J. Exp. Biol.*, 212: 3428–3439.
- Thomas, C. M. y J. Versalovic.** 2010. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes*, 1: 148–163.
- Thomson, R., H. L. Macpherson, A. Riaza y T. H. Birkbeck.** 2005. *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Appl. Microbiol.*, 99: 243–250.
- Top, J., J. C. Sinnige, E. A. Majoor, M. J. Bonten, R. J. Willems y W. van Schaik.** 2011. The recombinase IntA is required for excision of *esp*-containing ICEEfm1 in *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.*, 193: 1003–1006.
- Toranzo, A. E.** 2010. Patología bacteriana en acuicultura. *Actualidad SEM*, 50: 29–31.
- Toranzo, A. E., S. Devesa, J. L. Romalde, J. Lamas, A. Riaza, J. Leiro y J. L. Barja.** 1995. Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against *Enterococcus* sp. infection in turbot. *Aquaculture*, 134: 17–27.
- Toranzo, A. E., J. L. Romalde, C. P. Dopazo, B. Magariños y J. L. Barja.** 2004. Disease trends in the primary marine fish species cultured in Spain: A 20-year study. *World Aquaculture*: 35–38.
- Toranzo, A. E., B. Magariños y J. L. Romalde.** 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246: 37–61.
- Toranzo, A. E., B. Magariños, J. L. Romalde y J. L. Barja.** 2009. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. En: “*The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*”, pp. 155–176. Rogers C. y B. Basurco (eds). Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 86. CIHEAM, Zaragoza, España.
- Torriani, S., V. Gatto, S. Sembeni, R. Tofalo, G. Suzzi, N. Belletti, F. Gardini y S. Bover-Cid.** 2008. Rapid detection and quantification of tyrosine decarboxylase gene (*tdc*) and its expression in gram-positive bacteria associated with fermented foods using PCR-based methods. *J. Food Prot.*, 71: 93–101.
- Tovar-Ramírez, D., J.-L. Zambonino, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez y R. Lésel.** 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 204: 113–123.

- Tovar-Ramírez, D., J.-L. Zambonino, C. Cahu, F. J. Gatesoupe y R. Vázquez-Juárez.** 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, 234: 415–427.
- Tukmechi, A., H. R. Rahmati Andani, R. Manaffar y N. Sheikhzadeh.** 2011. Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.*, 30: 923–928.
- Twomey, D., R. P. Ross, M. Ryan, B. Meaney y C. Hill.** 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *A. Van Leeuw.*, 82: 165–185.
- Työppönen, S., E. Petäjä y T. Mattila-Sandholm.** 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 83: 233–244.
- van Baarlen, P., J. M. Wells y M. Kleerebezem.** 2013. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends Immunol.*, 34: 208–215.
- van Belkum, M. J. y M. E. Stiles.** 2000. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 17: 323–325.
- Vankerckhoven, V., T. Van Autgaerden, C. Vael, C. Lammens, S. Chapelle, R. Rossi, D. Jabes y H. Goossens.** 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 4473–4479.
- Vankerckhoven, V., G. Huys, M. Vancanneyt, C. Snauwaert, J. Swings, I. Klare, W. Witte, T. Van Autgaerden, S. Chapelle, C. Lammens y H. Goossens.** 2008. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 4247–4255.
- Varela, J. L., I. Ruiz-Jarabo, L. Vargas-Chacoff, S. Arijó, J. M. León-Rubio, I. García-Millán, M. P. Martín del Río, M. A. Moriñigo y J. M. Mancera.** 2010. Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture*, 309: 265–271.
- Vaseeharan, B. y P. Ramasamy.** 2003. Abundance of potentially pathogenic micro-organisms in *Penaeus monodon* larvae rearing systems in India. *Microbiol. Res.*, 158: 299–308.
- Vay, C., R. Cittadini, C. Barberis, C. Hernán Rodríguez, H. Perez Martínez, F. Genero y A. Famiglietti.** 2007. Antimicrobial susceptibility of non-enterococcal intrinsic glycopeptide-resistant Gram-positive organisms. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 57: 183–188.
- Vázquez, J. A., M. L. Cabo, M. P. González y M. A. Murado.** 2003. Survival of lactic acid bacteria in seawater: a factorial study. *Curr. Microbiol.*, 47: 508–513.
- Vázquez, J. A., M. P. González y M. A. Murado.** 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245: 149–161.
- Vendrell, D., J. L. Balcazar, I. Ruiz-Zarzuela, I. de Blas, O. Girones y J. L. Muzquiz.** 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 29: 177–198.
- Vendrell, D., J. L. Balcázar, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, O. Girones y J. Luis Múzquiz.** 2008. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 31: 337–345.

- Ventura, M. y R. Zink.** 2002. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 217: 141–154.
- Vermeiren, L., F. Devlieghere y J. Debevere.** 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 96: 149–164.
- Versalovic, J., T. Koeuth y J. R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 19: 6823–6831.
- Verschuere, L., J. Dhont, P. Sorgeloos y W. Verstraete.** 1997. Monitoring Biolog patterns and r/K-strategists in the intensive culture of *Artemia* juveniles. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 603–612.
- Verschuere, L., G. Rombaut, G. Huys, J. Dhont, P. Sorgeloos y W. Verstraete.** 1999. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2527–2533.
- Verschuere, L., H. Heang, G. Criel, P. Sorgeloos y W. Verstraete.** 2000a. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1139–1146.
- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos y W. Verstraete.** 2000b. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 655–671.
- Vidal-Carou, M. C., M. L. Izquierdo-Pulido, M. C. Martín-Morro y F. Mariné.** 1990. Histamine and tyramine in meat products: Relationship with meat spoilage. *Food Chem.*, 37: 239–249.
- Villamil, L., C. Tafalla, A. Figueras y B. Novoa.** 2002. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9: 1318–1323.
- Villamil, L., A. Figueras, M. Planas y B. Novoa.** 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*, 219: 43–56.
- Villamil, L., A. Figueras, M. Planas y B. Novoa.** 2010. *Pediococcus acidilactici* in the culture of turbot (*Psetta maxima*) larvae: administration pathways. *Aquaculture*, 307: 83–88.
- Vine, N. G., W. D. Leukes y H. Kaiser.** 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30: 404–427.
- Vinod, M. G., M. M. Shivu, K. R. Umesha, B. C. Rajeeva, G. Krohne, I. Karunasagar y I. Karunasagar.** 2006. Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture*, 255: 117–124.
- von Wright, A.** 2005. Regulating the safety of probiotics--the European approach. *Curr. Pharm. Des.*, 11: 17–23.
- von Wright, A. y L. Axelsson.** 2012. Lactic acid bacteria: an introduction. En: “*Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*”, pp. 1–16, 4ª edición. Lahtinen, S., A. C. Ouwehand, S. Salminen y A. von Wright (eds.). CRC Press, Taylor y Francis Group, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Walker, P. J. y J. R. Winton.** 2010. Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Vet. Res.*, 41: 51.
- Wallace, T. D., S. Bradley, N. D. Buckley y J. M. Green-Johnson.** 2003. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *J. Food Prot.*, 66: 466–472.

- Wang, C.-Y. C., H.-S. Shie, S.-C. Chen, J.-P. Huang, I.-C. Hsieh, M.-S. Wen, F.-C. Lin y D. Wu.** 2007. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *Int. J. Clin. Pract.*, 61: 68–73.
- Wang, L., Y. Chen, H. Huang, Z. Huang, H. Chen y Z. Shao.** 2013. Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Res.*: 1–10.
- Wang, Y.-B., Z.-R. Xu y M.-S. Xia.** 2005. The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fisheries Sci.*, 71: 1036–1041.
- Wang, Y.-B., Z.-Q. Tian, J.-T. Yao y W. Li.** 2008a. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277: 203–207.
- Wang, Y.-B., J.-R. Li y J. Lin.** 2008b. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook. *Aquaculture*, 281: 1–4.
- Weiss, A., K. J. Domig, W. Kneifel y H. K. Mayer.** 2010. Evaluation of PCR-based typing methods for the identification of probiotic *Enterococcus faecium* strains from animal feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 158: 187–196.
- Welker, T. L. y C. Lim.** 2011. Use of probiotics in diets of tilapia. *J. Aquac. Res. Development*, S1:014.
- Wells, J. M.** 2011. Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2: 423–445.
- Wells, J. M. y A. Mercenier.** 2003. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles. En: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 261–315. Wood, B. J. B. y P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, NY, EE.UU.
- Werner, G., R. J. Willems, B. Hildebrandt, I. Klare y W. Witte.** 2003. Influence of transferable genetic determinants on the outcome of typing methods commonly used for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 1499–1506.
- Werner, G., T. M. Coque, A. M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K. G. Kristinsson, R. Leclercq, C. H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L. V. Peixe, E. Sadowy, G. S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R. J. Willems, W. Witte y N. Woodford.** 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.*, 13: 1–11.
- Werner, G., C. Fleige, U. Geringer, W. van Schaik, I. Klare y W. Witte.** 2011. IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infect. Dis.*, 11: 80.
- Whyte, S. K.** 2007. The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.*, 23: 1127–1151.
- Wilson, M., E. Bengtén, N. W. Miller, L. W. Clem, L. Du Pasquier y G. W. Warr.** 1997. A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 4593–4597.
- Witte, W., R. Wirth y I. Klare.** 1999. Enterococci. *Chemotherapy*, 45: 135–145.
- Wolken, W. A., P. M. Lucas, A. Lonvaud-Funel y J. S. Lolkema.** 2006. The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.*, 188: 2198–2206.

- Xu, X., D. Lin, G. Yan, X. Ye, S. Wu, Y. Guo, D. Zhu, F. Hu, Y. Zhang, F. Wang, G. A. Jacoby y M. Wang.** 2010. VanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54: 4643–4647.
- Yousefian, M. y M. S. Amiri.** 2009. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *Afr. J. Biotechnol.*, 8: 7313–7318.
- Zhang, Z., T. Swain, J. Bogwald, R. A. Dalmo y J. Kumari.** 2009. Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes. *Fish Shellfish Immunol.*, 26: 677–684.
- Zhao, Y., W. Zhang, W. Xu, K. Mai, Y. Zhang y Z. Liufu.** 2012. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 32: 750–755.
- Zhou, J. S., P. K. Gopal y H. S. Gill.** 2001. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin *in vitro*. *Int J Food Microbiol.*, 63: 81–90.
- Zhou, X., Z. Tian, Y. Wang y W. Li.** 2010. Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Fish Physiol. Biochem.*, 36: 501–509.
- Zokaeifar, H., J. L. Balcazar, C. R. Saad, M. S. Kamarudin, K. Sijam, A. Arshad y N. Nejat.** 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, 33: 683–689.
- Zouhir, A., R. Hammami, I. Fliss y J. B. Hamida.** 2010. A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. *Protein J.*, 29: 432–439.

CAPÍTULO XIII

Resumen ampliado¹

¹Este resumen ampliado se presenta en cumplimiento de las directrices de la normativa del desarrollo del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, que regula los estudios del doctorado en la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº14, de 21 de diciembre de 2012) y de acuerdo con las especificaciones establecidas por la Comisión de Doctorado de la UCM.

XIII.1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la pesca extractiva parece haber alcanzado su cota máxima debido a la sobreexplotación de los recursos pesqueros y a la ausencia de nuevos caladeros, por lo que la acuicultura se perfila como la única posibilidad de que pueda cubrirse la creciente demanda mundial de pescado en el futuro (FAO, 2010). Uno de los principales retos a los que se enfrenta la acuicultura moderna para ofrecer un suministro suficiente y constante de productos de calidad y seguros es la prevención y el control de las ictiopatologías, especialmente las de etiología bacteriana que se presentan durante las etapas larvaria y de alevinaje, que provocan importantes mermas en la producción (Toranzo *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2009). Tradicionalmente se han utilizado los antibióticos (en muchas ocasiones de forma indiscriminada) como agentes terapéuticos y, en algunos casos, en los tratamientos profilácticos de las ictiopatologías bacterianas; no obstante, cada vez existe una mayor reticencia a su empleo, no sólo por parte de las agencias sanitarias sino también por las propias piscifactorías y los consumidores debido a sus posibles efectos perjudiciales para la salud animal y humana, la seguridad alimentaria y el medio ambiente (FAO, 2005; Cabello, 2006; EFSA, 2008b). Por todo ello en la mayoría de los países industrializados se han desarrollado regulaciones cada vez más restrictivas sobre el empleo de antibióticos en acuicultura, que incluyen, por ejemplo, la prohibición de su empleo como tratamiento profiláctico, la restricción del número de antibióticos autorizados, el control de su prescripción veterinaria, el establecimiento y vigilancia de límites máximos de residuos (LMR) y la prohibición expresa del empleo de determinados antibióticos por su elevada toxicidad o por su importancia en medicina humana y su capacidad para generar resistencias (FAO, 2005; Cabello, 2006; EFSA, 2008a, 2008b). A este respecto, aunque la vacunación constituye, en principio, el método ideal para la prevención de estas ictiopatologías, su aplicación en acuicultura resulta dificultada por su disponibilidad, grado de protección que confiere, coste, ineficacia en las etapas larvarias, retardo del crecimiento, limitación de su eficacia cuando existen otras enfermedades o cuando no se emplean inmunoestimulantes, alteraciones en la calidad del producto (*e.g.*, adherencias, inflamación crónica y melanosis), y, por último, el estrés que su empleo provoca en los peces, especialmente cuando se administran mediante inyección intraperitoneal, con la consiguiente repercusión en su respuesta inmune y, por lo tanto, en su productividad (EFSA, 2008a; Subasinghe, 2009; Toranzo *et al.*, 2009). En consecuencia, cada vez es mayor el interés por la investigación y el desarrollo de metodologías alternativas o complementarias a la quimioterapia y la vacunación que sean eficaces, seguras, sencillas, rentables económicamente y respetuosas con el medio ambiente. En este contexto, está adquiriendo una creciente relevancia el empleo de probióticos (Verschuere *et al.*, 2000; Irianto y Austin, 2002; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, 2010; Defoirdt *et al.*, 2011; Dimitroglou *et al.*, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014), que son cultivos microbianos vivos que ejercen un efecto beneficioso en el hospedador mediante: (i) la modificación de su microbiota y/o la de su medio ambiente; (ii) el incremento de la eficiencia en la

asimilación del alimento y/o su valor nutritivo; (iii) el incremento de su resistencia frente a las enfermedades; (iv) la mejora de su respuesta al estrés y su vigor, y/o (v) el incremento de la calidad del medio ambiente acuático en el que se desarrolla (Verschuere *et al.*, 2000). Con base en esta definición, los probióticos pueden incluir cultivos microbianos que: (i) previenen la adhesión y proliferación de microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal y las mucosas superficiales de los animales acuáticos, en las superficies de las piscifactorías y en el ambiente de cultivo; (ii) compiten eficazmente por los nutrientes disponibles; (iii) producen sustancias antimicrobianas; (iv) aseguran un aprovechamiento óptimo del alimento mediante su ayuda a la digestión (estimulación del crecimiento); (v) mejoran la calidad del agua, y/o (vi) estimulan la respuesta inmune (Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006; Vine *et al.*, 2006; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al.*, 2010). En este contexto, los principales mecanismos de acción por los que los probióticos ejercen su efecto beneficioso incluyen los siguientes: (i) supresión de microorganismos patógenos mediante exclusión competitiva mediada por la producción de uno o varios compuestos antimicrobianos bactericidas o bacteriostáticos (*e.g.*, bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, lisozima, amonio y diacetilo) y sideróforos (*e.g.*, de hierro), por la competencia por los nutrientes y la energía disponibles y/o por la competencia por los sitios de adhesión del intestino u otras superficies mucosas; (ii) mejora de la nutrición del hospedador debida al suministro de nutrientes (*e.g.*, ácidos grasos, vitaminas, poliaminas y aminoácidos esenciales) y/o favorecimiento de la digestión (*e.g.*, producción de lipasas, amilasas y proteasas); (iii) estimulación de la respuesta inmune local y sistémica del hospedador (*e.g.*, activación de la respuesta humoral, incremento de la actividad fagocítica y respiratoria, modulación de la proliferación y diferenciación celular, producción de lisozima, peroxidasa y proteasas, activación del complemento y producción de citoquinas), mediada por diversos componentes de la pared celular (*i.e.*, lipopolisacáridos, peptidoglicanos y β -glucanos), y, por último, (iv) incremento de la calidad del agua de cultivo (*e.g.*, conversión de materia orgánica en CO₂ y reducción de los niveles de amonio o nitritos) (Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006, 2007; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, 2010; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). La mayoría de los probióticos propuestos para su empleo en acuicultura pertenecen al grupo de las bacterias lácticas (principalmente *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., y *Pediococcus* spp.), a los géneros *Bacillus*, *Vibrio* y *Pseudomonas* y a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Verschuere *et al.*, 2000; Chabrillón *et al.*, 2007; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010; Dimitroglou *et al.*, 2011). Aunque las bacterias lácticas no constituyen la microbiota intestinal predominante de los peces, forman parte de la misma en muchos peces cultivados (Ringø *et al.*, 2000; Ringø y Holzapfel, 2000; Irianto y Austin, 2002; Gatesoupe, 2008; Desriac *et al.*, 2010; Ringø *et al.*, 2010), lo que avala su empleo como probióticos para la acuicultura (Verschuere *et al.*, 2000; Chabrillón *et al.*, 2007; Gatesoupe, 2008; Desriac *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, 2010). Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas son la competencia por nutrientes, la formación de ácidos orgánicos (ácidos láctico y acético) y la producción de sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica o proteica y

síntesis ribosomal denominadas bacteriocinas (Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). Considerando que la mayoría de las bacterias lácticas son seguras para el consumo animal y humano (estatus GRAS, del inglés *Generally Recognized As Safe*, establecido por la Agencia de Alimentos y Medicamentos [FDA] de EE.UU., o su equivalente europeo, estatus QPS, del inglés *Qualified Presumption of Safety*, establecido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA]) (EFSA, 2005a, 2005b, 2007) y que algunas cepas productoras de bacteriocinas (bacteriocinogénicas) inhiben a microorganismos patógenos responsables de infecciones humanas y animales y de reducir la productividad animal, se ha sugerido su empleo como probióticos tanto en personas como en animales de explotación para reducir el uso de antibióticos (Ryan *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1999; Kirkup, 2006; Gatesoupe, 2008; Gillor *et al.*, 2008; Millette *et al.*, 2008; Sang y Blecha, 2008).

XIII.2. OBJETIVOS

Con base en lo expuesto anteriormente, este trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos globales: (i) evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de bacterias lácticas, aisladas previamente por nuestro grupo de investigación de pescado, marisco y productos de la pesca, frente a bacterias patógenas de los peces; (ii) evaluación de su seguridad *in vitro* y tipificación molecular; (iii) evaluación *in vitro* de su capacidad inmunoestimuladora y propiedades funcionales; (iv) evaluación *in vivo* de su efecto en la protección de *Artemia franciscana* frente a *Vibrio campbellii*, y, por último, (v) evaluación *in vivo* de su seguridad para el rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) y de su capacidad para modular la expresión de genes de inmunidad en esta especie acuícola marina de gran interés comercial para España. Conviene destacar que aunque actualmente no existen directrices nacionales o internacionales específicas acerca de la evaluación de probióticos para su empleo en la acuicultura, la planificación y el desarrollo de estos objetivos se llevó a cabo considerando las recomendaciones internacionales generales para la evaluación del empleo de probióticos en los alimentos, como las que se reflejan en el documento *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, preparado por una Comisión Conjunta de Expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) (FAO/WHO, 2002). Asimismo, en este trabajo de investigación se tuvieron en consideración diversos documentos publicados por, entre otros, el Comité Científico para la Nutrición Animal (SCAN) de la EFSA acerca del estatus QPS, la evaluación de la seguridad de los microorganismos empleados en los alimentos y piensos, su identificación y filiación taxonómica y su resistencia a los antibióticos de importancia clínica (EFSA, 2005a, 2005b, 2007, 2011, 2012a, 2012b). Además, se consideraron también las recomendaciones recogidas en la reciente literatura científica sobre este tema de acuciante interés y actualidad e indudable importancia para la Salud Pública y la protección medioambiental (Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Gatesoupe, 2008; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010; Merrifield *et*

al., 2010; Dimitroglou *et al.*, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). Por todo ello, para lograr estos objetivos en este trabajo de investigación se procedió al desarrollo y consecución de los objetivos parciales que se enumeran a continuación:

1. Determinación del espectro de acción antimicrobiana de bacterias lácticas, aisladas previamente de pescado, marisco y productos de la pesca por nuestro grupo de investigación, frente a microorganismos patógenos Gram-positivos y Gram-negativos productores de ictiopatologías de relevancia para la acuicultura.
2. Evaluación de la seguridad *in vitro* de bacterias lácticas de origen acuático.
 - 2.1. Evaluación genotípica de la presencia de los determinantes genéticos que codifican la síntesis de diversos factores de virulencia descritos en el género *Enterococcus*.
 - 2.2. Evaluación fenotípica de la actividad hemolítica y gelatinasa.
 - 2.3. Evaluación genotípica y fenotípica de la susceptibilidad a diversos antibióticos empleados en medicina humana y veterinaria
 - 2.4. Evaluación fenotípica de la actividad mucinolítica.
 - 2.5. Evaluación fenotípica de la desconjugación de sales biliares.
 - 2.6. Evaluación fenotípica de diversas actividades enzimáticas.
 - 2.7. Evaluación fenotípica y genotípica de la producción de aminas biógenas.
3. Tipificación molecular de cepas de *Enterococcus faecium* de origen acuático.
4. Evaluación *in vivo* del efecto de bacterias lácticas de origen acuático en la protección de *Artemia franciscana* frente a *Vibrio campbellii*.
 - 4.1. Determinación del espectro de acción antimicrobiana frente a *V. campbellii*.
 - 4.2. Determinación del modo de acción frente a *V. campbellii*.
 - 4.3. Evaluación de su eficacia para la protección de *A. franciscana* frente a *V. campbellii* empleando ensayos de exposición de cultivos gnotobióticos.
5. Evaluación *in vitro* del efecto de bacterias lácticas de origen acuático en la viabilidad y estimulación de leucocitos de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.).
 - 5.1. Evaluación *in vitro* del efecto en la proliferación y muerte celular (apoptosis) de leucocitos de rodaballo.
 - 5.2. Evaluación *in vitro* del efecto en la estimulación del estallido respiratorio y la activación de la fagocitosis en leucocitos de rodaballo.

6. Determinación del espectro de acción antimicrobiana de bacterias lácticas de origen acuático frente a los principales ictiopatógenos que afectan al cultivo del rodaballo (*Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio splendidus*).
7. Evaluación *in vitro* de las propiedades funcionales y probióticas de bacterias lácticas de origen acuático.
 - 7.1. Evaluación de la capacidad para sobrevivir en el medio acuático marino.
 - 7.2. Evaluación de la capacidad para sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal (tolerancia a pH ácidos y bilis de rodaballo).
 - 7.3. Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie celular.
 - 7.4. Evaluación de la capacidad de adhesión al mucus de piel y de intestino de rodaballo.
 - 7.5. Evaluación de la capacidad para inhibir la adhesión de *T. maritimum* y *V. splendidus* al mucus de piel y de intestino de rodaballo.
8. Evaluación *in vivo* de la seguridad de bacterias lácticas de origen acuático para larvas y juveniles de rodaballo.
9. Evaluación *in vivo* del efecto de bacterias lácticas de origen acuático en la modulación de la expresión de genes de inmunidad en juveniles de rodaballo.

XIII.3. RESULTADOS

En el Capítulo III se describe la actividad antimicrobiana frente a ictiopatógenos Gram-positivos y Gram-negativos, la susceptibilidad a antibióticos y la prevalencia de factores de virulencia y actividades enzimáticas perjudiciales en 99 bacterias lácticas (59 del género *Enterococcus* y 40 de otros géneros) aisladas de pescado, marisco y productos de la pesca. Los resultados obtenidos revelaron que todas las bacterias lácticas tenían actividad antimicrobiana directa frente a, al menos, cuatro de los ocho ictiopatógenos evaluados empleando la técnica de inhibición por siembra en picadura (ISP). La evaluación inicial de la seguridad de los 59 enterococos (21 *Enterococcus faecalis* y 38 *Enterococcus faecium*) se llevó a cabo por la detección de factores de virulencia, el análisis de la producción de actividades hemolítica y gelatinasa y la susceptibilidad a diversos antibióticos de importancia clínica en medicina humana y veterinaria empleando la técnica de disco sobre agar. Con respecto a *E. faecalis*, el análisis mediante PCR mostró que la mayoría de las cepas (20 cepas, 95%) presentó, al menos, el gen que codifica un factor de virulencia relevante: antígeno de endocarditis de *E. faecalis* (*efaAfs*; 20 cepas, 95%), gelatinasa (*gelE*; 15 cepas, 71%) o sustancia de agregación (*agg*; 14 cepas, 67%). Con respecto a *E. faecium*, 20 cepas (53%) presentaron, al menos, un factor de virulencia de relevancia: *efaAfs* (17 cepas, 45%), *gelE* (9 cepas, 24%) o *agg* (3 cepas, 8%). La actividad gelatinasa se detectó en cepas de

E. faecalis y *E. faecium* (71 y 11%, respectivamente), mientras que un bajo número de *E. faecalis* (1 cepa; 5%) y ningún *E. faecium* presentó actividad hemolítica. Ninguno de los enterococos amplificó los genes *hyl* o *esp* que codifican una hipotética glicosil hidrolasa y una proteína de superficie de los enterococos, respectivamente. Los resultados del ensayo de susceptibilidad a antibióticos revelaron que 39 enterococos (66%) mostraron resistencia adquirida a antibióticos. A este respecto, 13 cepas de *E. faecalis* (62%) mostraron resistencia adquirida a (i) quinolonas de segunda generación (ciprofloxacino y/o norfloxacino) (12 cepas, 57%), (ii) rifampicina (5 cepas, 24%), (iii) nitrofurantoina (5 cepas, 24%), (iv) glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) (4 cepas, 19%), y/o (v) eritromicina (1 cepa, 5%). Sin embargo, 26 cepas de *E. faecium* (68%), mostraron resistencia adquirida a (i) eritromicina (14 cepas, 37%), (ii) nitrofurantoina (11 cepas, 29%), (iii) quinolonas de segunda generación (ciprofloxacino y/o norfloxacino) (10 cepas, 26%), (iv) rifampicina (4 cepas, 11%), (v) tetraciclina (2 cepas, 5%), y/o (vi) glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) (1 cepa, 3%). Además, se encontraron múltiples resistencias (dos a seis antibióticos) en *E. faecalis* (10 cepas, 48%) y, en menor medida, en *E. faecium* (12 cepas, 32%). De acuerdo con los resultados citados anteriormente, 21 cepas (100%) de *E. faecalis* se descartaron para posteriores estudios por la presencia de factores de virulencia (8 cepas, 38%), resistencias a antibióticos adquiridas (1 cepa, 5%) o ambos fenotipos (12 cepas, 57%). Con respecto a *E. faecium*, 29 cepas (76%) se descartaron por la presencia de factores de virulencia (3 cepas, 8%), resistencias a antibióticos adquiridas (9 cepas, 24%) o ambos fenotipos (17 cepas, 45%). Estos resultados permitieron seleccionar 9 *E. faecium* para su posterior evaluación. La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de 49 bacterias lácticas preseleccionadas (9 cepas de *E. faecium* seleccionadas por su seguridad inicial y el resto de las 40 cepas no enterococales) con actividad antimicrobiana directa frente a ictiopatógenos se evaluó frente a tres microorganismos mediante la técnica de difusión en agar (TDA). A este respecto, 24 cepas (49%) secretaron sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica y termorresistentes (*i.e.*, bacteriocinas) en sus sobrenadantes libres de células. Las 49 bacterias lácticas preseleccionadas se sometieron a una evaluación completa de su seguridad empleando diferentes ensayos *in vitro*. Se detectaron resistencias a antibióticos en los géneros *Weissella* (60%), *Pediococcus* (44%) y *Lactobacillus* (33%), pero no en los géneros *Leuconostoc* ni *Lactococcus*, empleando un ensayo de microdilución. La presencia de genes de resistencia a antibióticos se detectó por PCR en el 7,5% de las cepas no enterococales, incluyendo cepas del género *Pediococcus* (12,5%) y *Weissella* (6,7%). Una cepa de la especie *Pediococcus pentosaceus* y otra de la especie *Weissella cibaria* presentaron el gen *mef*(A/E) que confiere resistencia a la eritromicina y otras dos cepas de *P. pentosaceus* presentaron el gen *lnu*(A) que confiere resistencia a las lincosamidas. Esta es la primera descripción del gen *mef*(A/E) en los géneros *Pediococcus* y *Weissella*, así como de *lnu*(A) en el género *Pediococcus*. Ninguna de las 49 bacterias lácticas evaluadas desconjugó las sales biliares, ni mostró actividad mucinolítica u otras actividades enzimáticas perjudiciales. El protocolo *in vitro* desarrollado en este trabajo constituye una estrategia efectiva como

método de preselección a gran escala de bacterias lácticas potencialmente seguras para su empleo como probióticos en acuicultura.

En el Capítulo IV se describe la evaluación de la producción de aminas biógenas (histamina, tiramina y putrescina) por 74 bacterias lácticas de origen acuático, que se llevó a cabo empleando los siguientes métodos fenotípicos y genotípicos: (i) detección de la descarboxilación de aminoácidos en un medio diferencial en placas de cultivo; (ii) detección de las aminas biógenas por cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin-Layer Chromatography*), y (iii) detección de los genes que codifican la síntesis de las correspondientes enzimas descarboxilasas por PCR. Ninguna de las cepas evaluadas presentó actividades histidina y ornitina descarboxilasa, ni los genes que codifican la producción de las respectivas enzimas; sin embargo, todos los enterococos presentaron el gen que codifica la tirosina descarboxilasa (*tdc*), detectándose esta actividad enzimática en todos ellos excepto *E. faecium* BCS59 y *E. faecium* MV5. El análisis del operón de la tirosina descarboxilasa de estas cepas reveló la presencia de una secuencia de inserción integrada en la región promotora de *tdc* que impediría la transcripción de este gen y, por tanto, la producción de esta enzima.

En el Capítulo V se describe la evaluación de la seguridad de 14 cepas de *E. faecium* de origen alimentario potencialmente probióticas de acuerdo con la guía propuesta por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Empleando la técnica de PCR se determinó que ninguno de los enterococos presenta los genes *esp*, *hyl_{Efm}* y el elemento genético móvil *IS16*. Todas las cepas fueron susceptibles a la ampicilina ($MIC \leq 2$ mg/l) mediante el test de microdilución. Además, en este trabajo se determinó la relación genética los enterococos mediante PFGE y diversas técnicas moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante la técnica de PCR, concretamente amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD, del inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*), amplificación por PCR de secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (ERIC-PCR, del inglés *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*) y análisis de los patrones de restricción del ADN ribosómico amplificado por PCR (ARDRA, del inglés *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). El análisis de los patrones obtenidos con la técnica PFGE, empleando la enzima *Sma*I, permitió identificar cuatro subgrupos, a diferencia del análisis con las técnicas RAPD y ERIC-PCR que revelaron nueve y ocho subgrupos, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que ERIC-PCR permitió obtener el mayor índice de diversidad, seguido de RAPD y PFGE, mientras que por ARDRA se observó el valor más bajo. En este trabajo se muestra la ausencia de marcadores de virulencia en una colección de 14 cepas de *E. faecium* de origen alimentario con actividad antimicrobiana, sugiriendo que estas cepas son seguras para su empleo en la industria alimentaria o como probióticos en producción animal, y que la técnica de ERIC-PCR es una herramienta eficaz para el genotipado de enterococos potencialmente probióticos.

En el Capítulo VI se describe la actividad antimicrobiana de 33 bacterias lácticas frente al patógeno *V. campbellii*, la inhibición de este patógeno en cocultivos, la supervivencia en agua y el

efecto *in vivo* de bacterias lácticas inactivadas por calor y viables en la protección de *A. franciscana* frente a este patógeno empleando diferentes ensayos de cultivos gnotobióticos (axénicos). Empleando el medio de cultivo TSA (del inglés *Tryptone Soya Agar*) suplementado con glucosa (TSA-G; 0,25 y 0,60%, p/v), la mayoría de las bacterias lácticas (72,7 y 93,9%, respectivamente) presentaron actividad antimicrobiana frente a *V. campbellii* LMG21363. Después de 24 h de incubación en cocultivo, 26 de las 33 bacterias lácticas presentaron actividad bactericida frente a *V. campbellii* LMG21363. A este respecto, 21 de las 33 bacterias lácticas (63,3%) inhibieron totalmente el desarrollo de *V. campbellii* LMG21363 (disminución de 5–6 log), mientras que cinco de las 33 bacterias lácticas (15,2%) redujeron significativamente los recuentos de este patógeno (disminución de 2–4 log). Además, todas las bacterias lácticas sobrevivieron en medio acuático marino a 28 °C durante 48 h. En los ensayos de cultivos gnotobióticos, sólo los tratamientos con las cepas *E. faecium* CV1 inactivada (54%) y viable (48%) y *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* SMF161 inactivada (54%) mejoraron la supervivencia de los nauplios de *A. franciscana* frente a *V. campbellii* en agua de mar filtrada y autoclavada (121 °C, 15 min) (experimento 1) con respecto a los nauplios sin tratar con las bacterias lácticas (24%) ($p < 0,05$). Cuando se evaluó el efecto de las bacterias lácticas en agua de mar filtrada y autoclavada suplementada con glucosa (experimento 2), la mortalidad de *A. franciscana* aumentó, siendo el efecto dosis-dependiente debido a la ausencia de oxígeno originada por el metabolismo oxidativo de la glucosa por *V. campbellii*. Cuando se determinó el efecto de las bacterias lácticas en agua marina filtrada y autoclavada suplementada con caldo MRS (*de Man, Rogosa and Sharpe*) (experimento 3), ninguna bacterias lácticas mostró efecto perjudicial para *A. franciscana*. Además, la cepa *L. cremoris* SMF161 inactivada ejerció un efecto positivo en la supervivencia de artemia cuando los nauplios se cultivaron en presencia de MRS y fueron infectados con *V. campbellii* ($p < 0,05$). En el experimento 4 se evaluó el efecto de diversas combinaciones de bacterias lácticas para proteger a *A. franciscana* en agua de mar filtrada y autoclavada, observándose que sólo uno de los cinco grupos de bacterias lácticas evaluados, en el que se incluían las cepas *E. faecium* CV1 y *L. cremoris* SMF161, mejoró la supervivencia de *A. franciscana* empleando las formas inactivadas y viables de las bacterias (42 y 40,7%, respectivamente) ($p < 0,05$). En conclusión, nuestros resultados sugieren que *E. faecium* CV1 y *L. cremoris* SMF161 podrían mejorar el estatus nutricional de artemia y/o que alguna(s) molécula(s) podría(n) estimular la respuesta inmune innata de *A. franciscana* y mejorar su supervivencia frente a *V. campbellii*, aunque sería necesario realizar más estudios utilizando mejores condiciones nutricionales (*e.g.*, suplementación con levadura) en el cultivo de artemia para mejorar los efectos probióticos de las bacterias lácticas en relación a la protección de este crustáceo frente a este ictiopatógeno.

En el Capítulo VII se describe el efecto de ocho bacterias lácticas inactivadas por calor y viables de origen acuático (*E. faecium* CV1, *E. faecium* LPP29, *Lactobacillus curvatus* subesp. *curvatus* BCS35, *L. cremoris* SMF110, *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69, *P. pentosaceus* SMM73, *P. pentosaceus* TPP3 y *W. cibaria* P71) en la viabilidad y respuesta inmune innata de leucocitos de riñón anterior de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). A este respecto, los leucocitos de

rodaballo se incubaron con las bacterias lácticas inactivadas y viables a diferentes concentraciones. Después de la incubación, la viabilidad de los leucocitos se evaluó empleando ensayos colorimétricos (MTT [bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio] y LDH [lactato deshidrogenasa]) y un ensayo de detección de anexina V/ioduro de propidio (IP) empleando citometría de flujo. Las bacterias lácticas inactivadas no mostraron efecto citotóxico sobre los leucocitos de rodaballo, mientras que sus formas viables ejercieron distintos efectos en la apoptosis de linfocitos y fagocitos de esta especie acuícola. Las bacterias lácticas viables estimularon el estallido respiratorio y la fagocitosis de los leucocitos más eficientemente que sus formas inactivadas. Los resultados descritos indican la existencia de diversos mecanismos de interacción cepa-específicos entre las bacterias lácticas evaluadas y los leucocitos de rodaballo. Asimismo, en este trabajo se desarrolló un sistema eficaz de ensayos *in vitro* para evaluar los efectos inmunomoduladores de bacterias lácticas, el cual resulta de utilidad para la identificación y preselección de bacterias lácticas potencialmente probióticas.

En el Capítulo VIII se describe el potencial *in vitro* e *in vivo* de las ocho bacterias lácticas citadas anteriormente como probióticos para el cultivo del rodaballo. Todas las bacterias lácticas excepto *Lb. curvatus* BCS35 mostraron actividad antimicrobiana frente a, al menos, cuatro cepas de *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio splendidus*. Además, todas las bacterias lácticas sobrevivieron en el medio acuático marino a 18 °C durante 7 días y toleraron valores de pH 3,0 y bilis de rodaballo (10%, v/v); sin embargo, difirieron en la hidrofobicidad de su superficie celular (8,2–21,7%) y en su capacidad de adhesión al mucus de piel (1,2–21,7%) e intestino (0,7–2,1%) de rodaballo. La mayoría de las cepas evaluadas inhibió la adhesión de los ictiopatógenos al mucus de rodaballo. Con base en los resultados descritos anteriormente, se seleccionaron las cepas *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 por su actividad antimicrobiana frente a *T. maritimum* y *V. splendidus*, sus adecuadas propiedades funcionales y sus diferencias en la capacidad de adhesión al mucus e inhibición de la adhesión de patógenos al mucus de rodaballo. Estas dos cepas fueron inocuas cuando se administraron por baño a las larvas y juveniles de rodaballos. Además, el análisis por PCR en tiempo real de la transcripción de los genes relacionados con la inmunidad que codifican la interleuquina 1- β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), lisozima, complemento (C3), complejo mayor de histocompatibilidad-I α (MHC-I α) y complejo mayor de histocompatibilidad-II α (MHC-II α) en cinco órganos (riñón anterior, bazo, hígado, intestino y piel) reveló la capacidad de estas bacterias lácticas para estimular su expresión, especialmente la de los genes relacionados con la inmunidad inespecífica en los tejidos mucosos de juveniles de rodaballo. Los resultados de este trabajo demuestran la idoneidad de *Lc. cremoris* SMM69 y *W. cibaria* P71 como probióticos para el cultivo del rodaballo.

XIII.4. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este trabajo de investigación son las siguientes:

1. La actividad antimicrobiana frente a ictiopatógenos Gram-positivos y Gram-negativos es una propiedad probiótica generalizada entre las bacterias lácticas aisladas de pescado, marisco y productos de la pesca caracterizadas en este trabajo.
2. De las 99 bacterias lácticas evaluadas, 33 (8 *Enterococcus faecium*, 11 *Pediococcus pentosaceus*, 1 *Lactobacillus sakei* subesp. *carnosus*, 1 *Lactobacillus curvatus* subesp. *curvatus*, 3 *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris*, 3 *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* y 6 *Weissella cibaria*) pueden considerarse seguras debido a la ausencia de resistencia a antibióticos, factores de virulencia y actividades enzimáticas perjudiciales.
3. La resistencia a antibióticos y/o los factores de virulencia se detectaron en todas las cepas de *Enterococcus faecalis*, en *Enterococcus faecium* (79%) y, en menor medida, en las cepas no enterococales (37,5%). En este trabajo se describe por primera vez el gen que confiere resistencia a la eritromicina (*mef*[A/E]) en los géneros *Pediococcus* y *Weissella*, así como el gen de resistencia a lincosamidas (*lnu*[A]) en el género *Pediococcus*.
4. Ninguna de las bacterias lácticas de origen acuático presentó actividades histidina y ornitina descarboxilasa ni los genes que codifican la producción de las respectivas enzimas (*hdc* y *odc*, respectivamente); sin embargo, todos los enterococos presentaron el gen que codifica la tirosina descarboxilasa (*tdc*), detectándose esta actividad enzimática en todos ellos excepto en las cepas *Enterococcus faecium* BCS59 y *Enterococcus faecium* MV5, que poseen una secuencia de inserción integrada en la región promotora de *tdc* que impediría la transcripción de este gen.
5. De las técnicas evaluadas para la tipificación molecular de los enterococos (PFGE, RAPD, ERIC-PCR y ARDRA), la técnica ERIC-PCR fue la más eficaz. De acuerdo con los criterios establecidos por la EFSA, todos los enterococos se consideraron seguros por ser sensibles a la ampicilina y por no presentar marcadores de virulencia asociados a cepas hospitalarias (proteína de superficie enterococal [*esp*], glicosil hidrolasa [*hyl*_{EFm}] y secuencia de inserción IS16).
6. Este es el primer estudio a gran escala que evalúa la seguridad *in vitro* de bacterias lácticas de origen acuático empleando una aproximación más exhaustiva que la establecida por la EFSA para las bacterias lácticas con estatus QPS. El protocolo desarrollado constituye una estrategia adecuada como método de identificación y selección de bacterias lácticas potencialmente seguras para su empleo como probióticos en acuicultura.
7. Este es el primer estudio que describe bacterias lácticas con actividad antimicrobiana frente a *Vibrio campbellii* y su efecto bactericida frente a este ictiopatógeno en cocultivos. Los ensayos de exposición de cultivos gnotobióticos de *Artemia franciscana* mostraron que *Enterococcus faecium*

CV1 y *Lactococcus lactis* subesp. *cremoris* SMF161 protegen a este crustáceo frente a *Vibrio campbellii*.

8. Este es el primer estudio en el que se evalúa *in vitro* el efecto de bacterias lácticas viables e inactivadas sobre leucocitos de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). Las 8 bacterias lácticas inactivadas evaluadas no mostraron efecto citotóxico en los leucocitos de rodaballo, mientras que sus formas viables ejercieron distintos efectos en la apoptosis de linfocitos y fagocitos. Las bacterias lácticas viables estimularon el estallido respiratorio y la fagocitosis de los leucocitos más eficientemente que sus formas inactivadas. Estos resultados indican la existencia de diversos mecanismos de interacción cepa-específicos entre estas bacterias lácticas y los leucocitos de rodaballo.
9. De las 8 bacterias lácticas evaluadas, 7 presentaron actividad antimicrobiana frente a los ictiopatógenos del rodaballo *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio splendidus* y la mayoría de ellas mostraron unas adecuadas propiedades funcionales y probióticas, tales como supervivencia en medio acuático marino, tolerancia a valores de pH bajos y a bilis de rodaballo, adhesión al mucus de piel de rodaballo e inhibición de la adhesión de *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio splendidus* a este mucus y al del intestino.
10. *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69 y *Weissella cibaria* P71 resultaron inocuas *in vivo* para las larvas y juveniles de rodaballo tras su administración mediante baño.
11. Este es el primer estudio que describe la modulación de la transcripción de genes de inmunidad en diversos órganos de peces expuestos a bacterias lácticas mediante baño. *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69 y *Weissella cibaria* P71 poseen la capacidad de modular la transcripción de genes de inmunidad (interleuquina-1 β , factor de necrosis tumoral- α , lisozima, complemento, complejo mayor de histocompatibilidad-Ia y complejo mayor de histocompatibilidad-IIa) en riñón anterior, bazo, hígado, intestino y piel, especialmente los genes relacionados con la inmunidad inespecífica (interleuquina-1 β , lisozima y complemento) en las mucosas de juveniles de rodaballo.
12. Los resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo* demuestran que las cepas *Leuconostoc mesenteroides* subesp. *cremoris* SMM69 y *Weissella cibaria* P71 poseen un gran potencial como probióticos para el cultivo del rodaballo.

XIII.5. BIBLIOGRAFÍA

Almeida, A., Á. Cunha, N. C. Gomes, E. Alves, L. Costa y M. A. Faustino. 2009. Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Mar. Drugs*, 7: 268–313.

Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell y J. L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.*, 114: 173–186.

- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, A. C. Calvo, I. Márquez, O. Gironés y J. L. Muzquiz.** 2007. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *Br. J. Nutr.*, 97: 522–527.
- Cabello, F. C.** 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, 8: 1137–1144.
- Cintas, L. M., M. P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes y P. E. Hernández.** 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Tech. Int.*, 7: 281–305.
- Chabrilón, M., P. Díaz-Rosales, M. C. Balebona y M. A. Moriño.** 2007. Panorama Acuícola Magazine, marzo/abril: 28–34.
- Cotter, P. D., C. Hill y R. P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.*, 3: 777–788.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill y P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16: 1058–1071.
- Defoirdt, T., P. Sorgeloos y P. Bossier.** 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.*, 14: 251–258.
- Desriac, F., D. Defer, N. Bourgougnon, B. Brillet, P. Le Chevalier y Y. Fleury.** 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar. Drugs*, 8: 1153–1177.
- Dimitroglou, A., D. L. Merrifield, O. Carnevali, S. Picchietti, M. Avella, C. Daniels, D. Güroy y S. J. Davies.** 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production – A Mediterranean perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 30: 1–16.
- EFSA (European Food Safety Authority).** 2005a. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *The EFSA Journal*, 226: 1–12.
- EFSA.** 2005b. QPS-Qualified Presumption of Safety micro-organisms in food and feed. EFSA Scientific Colloquium, Summary Report, octubre 2005.
- EFSA.** 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal*, 587: 1–16.
- EFSA.** 2008a. Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed trout. *Annex I to the EFSA J.*, 796: 1–97.
- EFSA.** 2008b. Food safety considerations of animal welfare aspects of husbandry systems for farmed fish. *The EFSA J.*, 867: 1–24.
- EFSA.** 2011. Maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *The EFSA Journal*, 9: 1–82.
- EFSA.** 2012a. Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA Journal*, 10: 2682.
- EFSA.** 2012b. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10: 2740–2749.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).** 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fish. Tech. Paper*, 469: 1–97.
- FAO.** 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia.

- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization).** 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of joint FAO/WHO working group. London, Ontario, Canada. 11 p.
- Farzanfar, A.** 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 48: 149–158.
- Gatesoupe, F. J.** 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 107–114.
- Gillor, O., A. Etzion y M. A. Riley.** 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81: 591–606.
- Irianto, A. y B. Austin.** 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 25: 333–342.
- Kirkup, B. C.** 2006. Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: theoretical considerations, applied research, and practical applications. *Curr. Med. Chem.*, 13: 3335–3350.
- Merrifield, D. L., A. Dimitroglou, A. Foey, S. J. Davies, R. T. M. Baker, J. Bøgwald, M. Castex y E. Ringø.** 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302: 1–18.
- Millette, M., G. Cornut, C. Dupont, F. Shareck, D. Archambault y M. Lacroix.** 2008. Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic Acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 1997–2003.
- Nayak, S. K.** 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 2–14.
- Pérez-Sánchez, T., I. Ruiz-Zarzuela, I. de Blas y J. L. Balcázar.** 2014. Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Rev. Aquaculture*, 6: 133–146.
- Ringø, E. y W. Holzapfel.** 2000. Identification and characterization of carnobacteria associated with the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst. Appl. Microbiol.*, 23: 523–527.
- Ringø, E., H. R. Bendiksen, M. S. Wesmajervi, R. E. Olsen, P. A. Jansen y H. Mikkelsen.** 2000. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *J. Appl. Microbiol.*, 89: 317–322.
- Ringø, E., L. Løvmo, M. Kristiansen, Y. Bakken, I. Salinas, R. Myklebust, R. E. Olsen y T. M. Mayhew.** 2010. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquac. Res.*, 41: 451–467.
- Ross, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twomey, W. J. Meaney y C. Hill.** 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *A. Van Leeuw.*, 76: 337–346.
- Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross y C. Hill.** 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2287–2290.
- Sang, Y. y F. Blecha.** 2008. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim. Health Res. Rev.*, 9: 227–235.
- Subasinghe, R.** 2009. Disease control in aquaculture and the responsible use of veterinary drugs and vaccines: The issues, prospects and challenges. En: “*The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*”, pp. 5–11. Rogers C. y B. Basurco (eds). Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 86. CIHEAM, Zaragoza, España.

Toranzo, A., B. Magariños, J. L. Romalde y J. L. Barja. 2009. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. En: “*The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*”, pp. 155–176. Rogers C. y B. Basurco (eds). Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 86. CIHEAM, Zaragoza, España.

Toranzo, A. E., B. Magariños y J. L. Romalde. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246: 37–61.

Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos y W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 655–671.

Vine, N. G., W. D. Leukes y H. Kaiser. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30: 404–427.

CHAPTER XIII

Extended abstract²

²This extended abstract is included in fulfilment of the directives of the regulation of development of the Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, which regulates the studies of doctorate at the Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº14, de 21 de diciembre de 2012) and in agreement with the specifications established by the Commission of Doctorate of the UCM.

XIII.1. INTRODUCTION

Nowadays, extractive fishing seems to have reached its limit due to the over-exploitation of the fishing sources and the lack of new fishing grounds. Therefore, aquaculture is considered as the unique alternative to cover the world growing demand of fish in the future (FAO, 2010). One of the main challenges to be faced by the modern aquaculture industry to offer an enough and constant supply of safe and quality products is the prevention and control of fish diseases, mainly those of bacterial origin during the larval and early fry stages, which cause important losses in the production (Toranzo *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2009). Traditionally, antibiotics have been used (very often indiscriminately) as therapeutic and, in many cases, prophylactic agents against bacterial diseases; however, there is an overgrowing reticence for their use, not only by the health agencies but also by the fish farming sector and consumers, due to their harmful effects for the human and animal health, food safety and the environment (FAO, 2005; Cabello, 2006; EFSA, 2008b). Consequently, the majority of developed countries have enforced very stringent regulations about the use of antibiotics in aquaculture, such as the ban of antibiotics as prophylactic treatments, the restriction of authorized antibiotics, the control of veterinary prescription, the establishment and surveillance of Maximum Residue Limits (MRLs), and the ban of specific antibiotics due to their high toxicity or importance in human medicine and capability to induce antibiotic resistances (FAO, 2005; Cabello, 2006; EFSA, 2008a, 2008b). In this respect, although vaccination constitutes, in principle, the ideal control method, its application is hampered by several factors, such as availability, level of protection, economic cost, inefficacy in larval stages, growth delay, limitation in its efficacy when fish are infected by other pathogens or when immunostimulants are not used, alterations in product quality (*e.g.*, adhesion, chronic inflammation and melanosis), and, finally, animal stress, especially when vaccines are administered by intraperitoneal injection with the consequent repercussion in their immune response, and, therefore, in their productivity (EFSA, 2008a; Subasinghe, 2009; Toranzo *et al.*, 2009). Consequently, there is an increasing interest in the research and development of alternative or complementary strategies to chemotherapy and vaccination, which are effective, safe, easy to apply, economically efficient and environmentally friendly. In this context, there is a growing interest in the use of probiotics (Verschuere *et al.*, 2000; Irianto and Austin, 2002; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, 2010; Defoirdt *et al.*, 2011; Dimitroglou *et al.*, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014), which are defined as live microbial adjuncts which have a beneficial effect on the host by: (i) modifying the host-associated or ambient microbial community, (ii) improving feed use or enhancing its nutritional value, (iii) enhancing the host response towards disease, and/or (iv) improving the physico-chemical and microbiological quality of its environment (Verschuere *et al.*, 2000). Based on this definition, probiotics may include microbial adjuncts that (i) prevent the adhesion and proliferation of pathogenic microorganisms in the intestinal tract and superficial mucosa of aquatic animals, on the surfaces of fish farms, and in the aquatic environment of the cultured species; (ii)

compete for the available nutrients; (iii) produce antimicrobial compounds; (iv) secure an optimal use of the feed by aiding in its digestion (growth stimulation); (v) improve water quality, and/or (vi) stimulate the host immune system (Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006; Vine *et al.*, 2006; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al.*, 2010). In this context, the main mechanisms of action by which probiotics exert their beneficial effects are the following: (i) inhibition of the pathogenic microorganisms by competitive exclusion by means of production of bactericidal or bacteriostatic antimicrobial compounds (*e.g.*, bacteriocins, organic acid, hydrogen peroxide, lysozyme, ammonium and diacetyl) and siderophores (*e.g.*, of iron), competition by the adhesion sites of intestine and other superficial mucosa; (ii) improvement of the host nutrition due to the nutrient supply (*e.g.*, fatty acid, vitamins, polyamines, and essential amino acids) and/or enhancement of its digestion (*e.g.*, production of lipases, amylases, and proteases); (iii) stimulation of local and systemic immune response (*e.g.*, activation of humoral response, increase of phagocytic and respiratory burst activities, modulation of the cellular proliferation and differentiation, production of lysozyme, peroxidase and proteases, complement activation, and production of cytokines) by different cell wall components (*e.g.*, lipopolysaccharides, peptidoglycans, and β -glucans), and finally (iv) improvement of water quality (*e.g.*, conversion of organic matter in CO₂ and reduction of ammonium and nitrite levels) (Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006, 2007; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, 2010; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). Most probiotics proposed as biocontrollers and bioremediation agents for aquaculture belong to the lactic acid bacteria group (mainly to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, and *Carnobacterium*), to the genera *Bacillus*, *Vibrio*, and *Pseudomonas*, and to the species *Saccharomyces cerevisiae* (Verschuere *et al.*, 2000; Chabrillón *et al.*, 2007; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010; Dimitroglou *et al.*, 2011). Despite lactic acid bacteria do not constitute the predominant intestinal microbiota of fish, these bacteria are part of this microbiota (Ringø *et al.*, 2000, 2010; Ringø and Holzapfel, 2000; Irianto and Austin, 2002; Gatesoupe, 2008; Desriac *et al.*, 2010), supporting their use as probiotics in aquaculture (Verschuere *et al.*, 2000; Chabrillón *et al.*, 2007; Gatesoupe, 2008; Merrifield *et al.*, 2010). The main antagonistic mechanisms of lactic acid bacteria are the competence for nutrients, formation of organic acids (lactic and acetic acid), and the production of ribosomally-synthesized antimicrobial peptides or proteins referred to as bacteriocins (Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). Considering that most lactic acid bacteria are currently considered as safe microorganisms for human and animal consumption (GRAS [Generally Recognized As Safe] status, established by the Food and Drug Administration [FDA] in USA, or its European equivalent, QPS [Qualified Presumption of Safety] status, established by the European Food Safety Agency [EFSA]) (EFSA, 2005a, 2005b, 2007), and that some strains producing bacteriocins (bacteriocinogenic) inhibit pathogenic microorganisms responsible for human and animal infections and reduction of animal production, their use as probiotics in humans and animals in order to reduce the use of antibiotics has been suggested (Ryan *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1999; Kirkup, 2006; Gatesoupe, 2008; Gillor *et al.*, 2008; Millette *et al.*, 2008; Sang and Blecha, 2008).

XIII.2. OBJETIVES

Considering all the above mentioned, the main goals of the present research work are the following: (i) *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity against pathogenic bacteria of lactic acid bacteria previously isolated by our research group from fish, seafood and fish products; (ii) evaluation of their *in vitro* safety and molecular typification; (iii) *in vitro* evaluation of their immunostimulatory ability and functional properties; (iv) *in vivo* evaluation of their effect on the protection of *Artemia franciscana* against *Vibrio campbellii*; (v) *in vivo* evaluation of their safety for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and their ability to modulate the expression of immune genes in this marine aquatic species of commercial interest for Spain. It is worthy to note that, although there are no specific national or international guidelines about the evaluation of probiotics intended for use in aquaculture, the planning and development of the objectives of this research work were carried out considering the international general recommendations for the evaluation of the use of probiotics in food, such as the Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, made by a Joint FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)/WHO (World Health Organization) Working Group (FAO/WHO, 2002). Likewise, several documents published by the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) of EFSA about QPS status, safety assessment of microorganisms used in food and feed, their identification and taxonomic identification, and their resistance to antibiotic of clinical importance have been taken into consideration in this research work (EFSA, 2005a, 2005b, 2007, 2011, 2012a, 2012b). Additionally, the recommendations of recent scientific literature about this issue of great interest and undeniable importance for the Public Health and environmental protection were also considered (Verschuere *et al.*, 2000; Gatesoupe, 2008; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Nayak, 2010; Ringø *et al.*, 2010; Merrifield *et al.*, 2010; Dimitroglou *et al.*, 2011; Pérez-Sánchez *et al.*, 2014). In order to achieve these general goals, the following partial objectives were addressed in this research work:

1. Determination of the antimicrobial activity spectrum of lactic acid bacteria, previously isolated from fish, seafood, and fish products by our research group, against Gram-positive and Gram-negative pathogenic microorganisms responsible for fish disease of relevance for aquaculture.
2. *In vitro* safety assessment of lactic acid bacteria of aquatic origin.
 - 2.1. Genotypic evaluation of the genetic determinants encoding the synthesis of several virulence factors identified in the genus *Enterococcus*.
 - 2.2. Phenotypic evaluation of hemolytic and gelatinase activities.
 - 2.3. Genotypic and phenotypic evaluation of the susceptibility to antibiotics used in human and animal medicine.
 - 2.4. Phenotypic evaluation of mucinolytic activity.

- 2.5. Phenotypic evaluation of bile salt deconjugation.
- 2.6. Phenotypic evaluation of several enzymatic activities.
- 2.7. Genotypic and phenotypic evaluation of biogenic amine production.
3. Molecular typification of *Enterococcus faecium* strains of aquatic origin.
4. *In vivo* evaluation of the effect of lactic acid bacteria of aquatic origin on the protection of *Artemia franciscana* against *Vibrio campbellii*.
 - 4.1. Determination of the antimicrobial activity spectrum against *V. campbellii*.
 - 4.2. Determination of the mode of action against *V. campbellii*.
 - 4.3. Evaluation of their efficacy for the protection of *A. franciscana* against *V. campbellii* using gnotobiotic challenge tests.
5. *In vitro* evaluation of the effect of lactic acid bacteria of aquatic origin on the viability and stimulation of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) leucocytes.
 - 5.1. *In vitro* evaluation of the effect on the proliferation and cell death (apoptosis) of turbot leucocytes.
 - 5.2. *In vitro* evaluation of the effect on the respiratory burst activity and phagocytosis activation in turbot leucocytes.
6. Determination of the antimicrobial activity spectrum of lactic acid bacteria of aquatic origin against the main fish pathogens affecting turbot farming (*Tenacibaculum maritimum* and *Vibrio splendidus*).
7. *In vitro* evaluation of the functional and probiotics properties of lactic acid bacteria of aquatic origin.
 - 7.1. Evaluation of their ability to survive in seawater.
 - 7.2. Evaluation of their ability to survive to the conditions of the gastrointestinal tract (tolerance to low pH and turbot bile).
 - 7.3. Evaluation of the cell surface hydrophobicity.
 - 7.4. Evaluation of the adhesion ability to turbot skin and intestinal mucus.
 - 7.5. Evaluation of the ability to inhibit the adhesion of *T. maritimum* and *V. splendidus* to turbot skin and intestinal mucus.
8. *In vivo* evaluation of the safety of lactic acid bacteria of aquatic origin in turbot larvae and juveniles.
9. *In vivo* evaluation of the effect of lactic acid bacteria of aquatic origin on the modulation of the expression of immunity genes in turbot juveniles.

XIII.3. RESULTS

In Chapter III, the antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative fish pathogens, the antibiotic susceptibility, and the prevalence of virulence factors and detrimental enzymatic activities in 99 lactic acid bacteria (59 enterococci and 40 non-enterococci) isolated from fish, seafood and fish products is described. The obtained results revealed that all lactic acid bacteria displayed direct antimicrobial activity against, at least, four of the eight tested indicator microorganisms using a stab-on-agar test (SOAT). Preliminary safety evaluation of the 59 enterococci (21 *Enterococcus faecalis* and 38 *Enterococcus faecium*) was carried out by detection of potential virulence factors, analysis of hemolysin and gelatinase production, and susceptibility testing to several antibiotics of relevance for human and veterinary medicine by disk diffusion test. Concerning *E. faecalis*, the analysis by PCR showed that most of the strains (20 strains, 95%) harboured, at least, one relevant virulence factor: *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen (*efaAfs*; 20 strains, 95%), gelatinase (*gelE*; 15 strains, 71%), or aggregation substance (*agg*; 14 strains, 67%). With regard to *E. faecium*, 20 strains (53%) harboured, at least, one relevant virulence factor: *efaAfs* (17 strains, 45%), *gelE* (9 strains, 24%) or *agg* (3 strains, 8%). Gelatinase activity was found in *E. faecalis* and *E. faecium* (71 and 11%, respectively), while a low number of *E. faecalis* (1 strain, 5%) and none *E. faecium* exerted hemolytic activity. None of the enterococci amplified *hyl* or *esp* genes encoding a putative glycosyl hydrolase and the enterococcal surface protein, respectively. The results of the antibiotic susceptibility tests revealed that 39 enterococcal strains (66%) displayed acquired antibiotic resistance. In this respect, 13 *E. faecalis* strains (62%) showed acquired resistance to (i) second generation quinolones (ciprofloxacin and/or norfloxacin) (12 strains, 57%), (ii) rifampicin (5 strains, 24%), (iii) nitrofurantoin (5 strains, 24%), (iv) glycopeptides (vancomycin and teicoplanin) (4 strains, 19%), and/or (v) erythromycin (1 strain, 5%). However, 26 *E. faecium* strains (68%) displayed acquired resistance to (i) erythromycin (14 strains, 37%), (ii) nitrofurantoin (11 strains, 29%), (iii) second generation quinolones (ciprofloxacin and/or norfloxacin) (10 strains, 26%), (iv) rifampicin (4 strains, 11%), (v) tetracycline (2 strains, 5%), and/or (vi) glycopeptides (vancomycin and teicoplanin) (1 strain, 3%). Moreover, multiple antibiotic resistance (two to six antibiotics) was found in *E. faecalis* (10 strains, 48%) and, to a lesser extent, in *E. faecium* (12 strains, 32%). According to the results above, 21 *E. faecalis* strains (100%) were discarded for further studies based on the presence of virulence factors (8 strains, 38%), acquired antibiotic resistance (1 strain, 5%) or both (12 strains, 57%). Regarding *E. faecium* strains, 29 (76%) were eliminated from further screening based on acquired antibiotic resistance (9 strains, 24%), the presence of virulence factors (3 strains, 8%) or both (17 strains, 45%). Overall, these results allowed the selection of 9 *E. faecium* strains for further evaluation. The antimicrobial activity of supernatants from the 49 pre-selected lactic acid bacteria (9 *E. faecium* selected based on their preliminary safety assessment and the remaining 40 non-enterococcal strains) with direct antimicrobial activity against fish pathogens was assayed against three indicator microorganisms by an agar well-diffusion test

(ADT). In this regard, 24 (49%) strains secreted heat-stable proteinaceous antimicrobial substances (*i.e.*, bacteriocins) in their cell-free culture supernatants. The 49 pre-selected lactic acid bacteria were further subjected to a comprehensive safety assessment by different *in vitro* tests. Safety concerns based on antibiotic resistance determined by a broth microdilution test were found in the genera *Weissella* (60%), *Pediococcus* (44%) and *Lactobacillus* (33%), but not in leuconostocs and lactococci. Antibiotic resistance genes, analyzed by PCR, were found in 7.5% of the non-enterococci, including the genera *Pediococcus* (12.5%) and *Weissella* (6.7%). One strain of both *Pediococcus pentosaceus* and *Weissella cibaria* carried the erythromycin resistance gene *mef*(A/E), and another two *P. pentosaceus* strains harboured *lnu*(A) conferring resistance to lincosamides. This is the first description of *mef*(A/E) in the genera *Pediococcus* and *Weissella*, and of *lnu*(A) in the genus *Pediococcus*. None of the strains (enterococci and non-enterococci) showed bile deconjugation and mucin degradation abilities, or other detrimental enzymatic activities. The *in vitro* subtractive screening presented in this work constitutes a valuable strategy for the large-scale preliminary selection of putatively safe lactic acid bacteria intended for use as probiotics in aquaculture.

In Chapter IV, biogenic amine production (histamine, tyramine and putrescine) by a collection of 74 lactic acid bacteria of aquatic origin was investigated by means of: (i) amino acid decarboxylation by growth on decarboxylase differential medium; (ii) biogenic amine detection by thin-layer chromatography (TLC), and (iii) decarboxylase genes detection by PCR. None of the tested strains showed neither production of histamine and putrescine, nor presence of the genetic determinants encoding the corresponding decarboxylase activities. However, the tyrosine decarboxylase gene (*tdc*) was present in all the enterococcal strains, and tyramine production was detected by TLC in all of them but *E. faecium* BCS59 and *E. faecium* MV5. Analysis of the tyrosine decarboxylase operon of these strains revealed the presence of an insertion sequence upstream *tdc* that could be responsible for their lack of tyrosine decarboxylase activity.

In Chapter V, the safety of 14 potential probiotic *E. faecium* strains isolated from food was investigated following the guidance proposed by the European Food Safety Agency (EFSA). As shown by PCR, none of the enterococci harboured the genes *esp* and *hyl*_{Efm}, and the mobile insertion sequence *IS16*. All strains were susceptible to ampicillin (MIC ≤ 2 mg/L) by microdilution test. Moreover, the diversity and genetic relatedness of these enterococci were determined using molecular genotyping techniques such as PFGE and three PCR-based typing methods, namely random amplified polymorphic DNA (RAPD), enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) and restriction analysis of amplified *16S rDNA* (ARDRA). PFGE analysis of *Sma*I macrorrestriction patterns evidenced four subgroups in contrast with RAPD and ERIC-PCR analysis that gave nine and eight different subgroups, respectively. The results showed that ERIC-PCR yielded the highest diversity index, followed by RAPD and PFGE, while ARDRA achieved the lowest diversity value. This work demonstrates the absence of several well-known enterococcal virulence markers in a collection of *E.*

faecium strains with antimicrobial activity, which renders them safe to be used in the food industry or as probiotics in animal production, as well as that ERIC-PCR is a reliable tool for the molecular genetic profiling of potential probiotic enterococci.

In Chapter VI, the antimicrobial activity of lactic acid bacteria against the pathogen *V. campbellii*, the growth inhibition of this pathogen in co-cultures, the seawater survival, and the *in vivo* effect of heat-inactivated and viable lactic acid bacteria on the protection of *A. franciscana* against *V. campbellii* using four different gnotobiotic (axenic) challenge tests is described. From a total of 33 lactic acid bacteria, 24 (72.7%) and 31 (93.9%) exerted antimicrobial activity against *V. campbellii* LMG21363 in Tryptone Soya Agar (TSA) supplemented with glucose (0.25 and 0.60%, w/v, respectively). After 24 h of incubation in co-culture, 26 out of 33 lactic acid bacteria were bactericidal against *V. campbellii* LMG21363. Namely, 21 out of 33 lactic acid bacteria (63.3%) totally inhibited the growth of *V. campbellii* LMG21363 (5–6 log decrease), while five out of 33 lactic acid bacteria (15.2%) reduced significantly the counts of this pathogen (2–4 log decrease). Moreover, all lactic acid bacteria survived in seawater at 28 °C for 48 h. In the gnotobiotic challenge tests, only heat-inactivated (54%) and viable *E. faecium* CV1 (48%) and heat-inactivated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMF161 (54%) significantly enhanced the survival of the infected nauplii in filtered (0.22 µm) and autoclaved (121 °C, 15 min) seawater (FASW) (experiment 1) with respect to infected nauplii in the absence of lactic acid bacteria (24%) ($p < 0.05$). When the effect of lactic acid bacteria was evaluated in FASW supplemented with glucose (experiment 2), *A. franciscana* mortality increased in a glucose concentration-dependent manner in all infected animals, probably due to the oxygen starvation caused by the oxidative metabolism of glucose by *V. campbellii*. When the effect of lactic acid bacteria was evaluated in FASW supplemented with de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (experiment 3), none of the lactic acid bacteria showed a detrimental effect on *A. franciscana*. Moreover, only heat-inactivated *L. cremoris* SMF161 showed a positive effect on *A. franciscana* survival when nauplii were previously cultured with this strain in FASW supplemented with MRS and then infected with *V. campbellii* ($p < 0.05$). In the experiment 4, the effect of different lactic acid bacteria grouped in pools on the protection of *A. franciscana* was determined in FASW. Only one out of the five groups of heat-inactivated or viable lactic acid bacteria, in which the strains *E. faecium* CV1 and *L. cremoris* SMF161 were included, improved *A. franciscana* survival (42 and 40.7%, respectively; $p < 0.05$). In conclusion, our data suggest that *E. faecium* CV1 and *L. cremoris* SMF161 could improve artemia nutritional status and/or that some molecule(s) could stimulate the innate immune response of *A. franciscana* and enhance its survival against *V. campbellii*, although further studies need to be carried out using improved *A. franciscana* nutrition conditions (e.g., by supplementation with yeast) in an attempt to enhance lactic acid bacteria probiotic effects related to the protection of *A. franciscana* against this pathogen.

In Chapter VII, the *in vitro* effects of eight heat-inactivated and viable lactic acid bacteria of aquatic origin (*E. faecium* CV1, *E. faecium* LPP29, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* BCS35, *L. cremoris* SMF110, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* SMM69, *P. pentosaceus* SMM73, *P. pentosaceus* TPP3 and *W. cibaria* P71) on the viability and innate immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) leucocytes were assessed. In this sense, turbot head-kidney leucocytes were incubated with viable and heat-inactivated lactic acid bacteria at different concentrations. After incubation, the viability of leucocytes was evaluated using colorimetric methods (MTT [3-[4,5-dimethylthiazolyl-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide] and LDH [lactate dehydrogenase]) and a double staining flow cytometric assay (annexin V/propidium iodide). Heat-inactivated lactic acid bacteria showed no cytotoxic effect while viable lactic acid bacteria exerted a variable influence on apoptosis of turbot phagocytes and lymphocytes. Leucocyte respiratory burst activity and phagocytosis were also differentially activated, as viable lactic acid bacteria stimulated leucocytes more efficiently than the heat-inactivated lactic acid bacteria. Our results suggest the presence of diverse strain-specific mechanisms of interaction between the evaluated lactic acid bacteria and turbot leucocytes. Furthermore, this work sets up *in vitro* systems to evaluate the effect of lactic acid bacteria, which will be useful to develop efficient screening strategy for the selection of potential probiotic lactic acid bacteria.

In Chapter VIII, the *in vitro* and *in vivo* potential of the eight lactic acid bacteria cited above as turbot probiotics is described. Seven out of the eight lactic acid bacteria exerted direct antimicrobial activity against, at least, four strains of *Tenacibaculum maritimum* and *Vibrio splendidus*. All lactic acid bacteria survived in seawater at 18 °C for 7 days, and withstood exposure to pH 3.0 and 10% (v/v) turbot bile; however, they differed in cell surface hydrophobicity (8.2–21.7%) and in their ability to adhere to turbot skin (1.2–21.7%) and intestinal (0.7–2.1%) mucus. Most of the tested strains inhibited the binding of turbot pathogens to the mucus. *Lc. cremoris* SMM69 and *W. cibaria* P71 were selected based on their strong antimicrobial activity against *T. maritimum* and *V. splendidus*, good functional properties, and different adhesion ability to skin mucus and ability to inhibit the adhesion of turbot pathogens to mucus. These two lactic acid bacteria strains were harmless when administered by bath to turbot larvae and juveniles; moreover, real-time PCR on the transcription levels of the immunity-related genes encoding interleukin-1 β (IL-1 β), tumour necrosis factor- α (TNF- α), lysozyme, complement (C3), major histocompatibility complex I- α (MHC-I α) and major histocompatibility complex II- α (MHC-II α) in five organs (head-kidney, spleen, liver, intestine and skin) revealed the ability of these lactic acid bacteria to stimulate their expression in turbot juveniles, especially the non-specific immunity associated genes in mucosal tissues. Based on our results, *Lc. cremoris* SMM69 and *W. cibaria* P71 may be considered as suitable probiotic candidates for turbot farming.

XIII.4. CONCLUSIONS

The conclusions obtained in this research work are the following:

1. The antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive fish pathogens is a common probiotic property amongst the lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products characterized in this work.
2. From the 99 lactic acid bacteria which were tested, 33 (8 *Enterococcus faecium*, 11 *Pediococcus pentosaceus*, 1 *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*, 1 *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, 3 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 3 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* and 6 *Weissella cibaria*) might be considered as safe due to the lack of antibiotic resistances, virulence factors and detrimental enzymatic activities.
3. Antibiotic resistances and/or virulence factors were detected in all the strains of *Enterococcus faecalis*, in *Enterococcus faecium* (79%) and, to a lesser extent, in the non-enterococcal strains (37.5%). This work describes for the first time the gene conferring resistance to erythromycin (*mef*[A/E]) in the genera *Pediococcus* and *Weissella*, and the gene responsible for the resistance to lincosamides (*lnu*[A]) in the genus *Pediococcus*.
4. None of the lactic acid bacteria showed neither histidine and ornithine decarboxylase activities nor the genes encoding the corresponding decarboxylase activities (*hdc* and *odc*, respectively); however, all the enterococcal strains harboured the gene encoding the tyrosine decarboxylase (*tdc*), and all of them showed this enzymatic activity but *Enterococcus faecium* BCS59 and MV5, which harboured an insertion sequence upstream *tdc* that could hamper the transcription of this gene.
5. From the techniques evaluated for the molecular typification of enterococci (PFGE, RAPD, ERIC-PCR and ARDRA), ERIC-PCR was the most effective. According to the EFSA guidelines, all the enterococci were considered as safe since they were sensitive to ampicillin and did not harbour any of the virulence markers associated with hospital-associated strains (enterococcal surface protein [*esp*], glycosyl hydrolase [*hyl*_{Efm}] and IS16 insertion sequence).
6. This is the first large-scale study evaluating the *in vitro* safety of lactic acid bacteria of aquatic origin using an approximation more exhaustive than that established by EFSA for lactic acid bacteria awarded with the QPS status. The protocol developed constitutes an adequate subtractive screening strategy for the identification and selection of potentially safe lactic acid bacteria intended for use as probiotics in aquaculture.
7. This is the first study describing lactic acid bacteria with antimicrobial activity against *Vibrio campbellii* and their bactericidal effect against this fish pathogen in co-cultures. The gnotobiotic challenge tests using *Artemia franciscana* showed that *Enterococcus faecium* CV1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMF161 protect this crustacean against *Vibrio campbellii*.

8. This is the first study evaluating the *in vitro* effect of viable and inactivated lactic acid bacteria on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) leucocytes. The 8 tested lactic acid bacteria showed no cytotoxic effect on turbot leucocytes while viable lactic acid bacteria exerted different effects on apoptosis of turbot phagocytes and lymphocytes. Viable lactic acid bacteria stimulated the leucocyte respiratory burst activity and phagocytosis more efficiently than their corresponding inactivated forms. These results indicate the existence of diverse strain-specific mechanisms of interaction between these lactic acid bacteria and turbot leucocytes.
9. From the 8 tested lactic acid bacteria, 7 displayed antimicrobial activity against the turbot pathogens *Tenacibaculum maritimum* and *Vibrio splendidus*, and most of them showed interesting functional and probiotic properties, such as survival in seawater, tolerance to low pH and turbot bile, adhesion to turbot skin mucus, and inhibition of the adhesion of *Tenacibaculum maritimum* and *Vibrio splendidus* to this mucus and intestinal mucus.
10. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* SMM69 and *Weissella cibaria* P71 were shown to be harmless *in vivo* for turbot larvae and juveniles after bathing administration.
11. This is the first study describing the modulation of the transcription of fish immunity-related genes in several organs of fish bathed with lactic acid bacteria. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* SMM69 and *Weissella cibaria* P71 modulated the transcription of immunity-associated genes (interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , lysozyme, complement, major histocompatibility complex-I α and major histocompatibility complex-II α) in head-kidney, spleen, liver, intestine and skin, especially the non-specific immunity genes (interleukin-1 β , lysozyme and complement) in the mucosal tissues of turbot juveniles.
12. The results of the *in vitro* and *in vivo* assays demonstrate that *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* SMM69 and *Weissella cibaria* P71 possess a great potential as probiotics in turbot farming.

XIII.5. REFERENCES

- Almeida, A., Á. Cunha, N. C. Gomes, E. Alves, L. Costa, and M. A. Faustino. 2009. Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Mar. Drugs*, 7: 268–313.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell, and J. L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.*, 114: 173–186.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, A. C. Calvo, I. Márquez, O. Gironés, and J. L. Múzquiz. 2007. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *Br. J. Nutr.*, 97: 522–527.
- Cabello, F. C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, 8: 1137–1144.

- Cintas, L. M., M. P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes, and P. E. Hernández.** 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Tech. Int.*, 7: 281–305.
- Chabrilón, M., P. Díaz-Rosales, M. C. Balebona, and M. A. Moriño.** 2007. Panorama Acuícola Magazine, marzo/abril: 28–34.
- Cotter, P. D., C. Hill, and R. P. Ross.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.*, 3: 777–788.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill, and P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.*, 16: 1058–1071.
- Defoirdt, T., P. Sorgeloos, and P. Bossier.** 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.*, 14: 251–258.
- Desriac, F., D. Defer, N. Bourgougnon, B. Brillet, P. Le Chevalier, and Y. Fleury.** 2010. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Mar. Drugs*, 8: 1153–1177.
- Dimitroglou, A., D. L. Merrifield, O. Carnevali, S. Picchietti, M. Avella, C. Daniels, D. Güroy, and S. J. Davies.** 2011. Microbial manipulations to improve fish health and production – A Mediterranean perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 30: 1–16.
- EFSA (European Food Safety Authority).** 2005a. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *The EFSA Journal*, 226: 1–12.
- EFSA.** 2005b. QPS-Qualified Presumption of Safety micro-organisms in food and feed. EFSA Scientific Colloquium, Summary Report, octubre 2005.
- EFSA.** 2007. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *The EFSA Journal*, 587: 1–16.
- EFSA.** 2008a. Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed trout. *Annex I to the EFSA J.*, 796: 1–97.
- EFSA.** 2008b. Food safety considerations of animal welfare aspects of husbandry systems for farmed fish. *The EFSA J.*, 867: 1–24.
- EFSA.** 2011. Maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *The EFSA Journal*, 9: 1–82.
- EFSA.** 2012a. Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA Journal*, 10: 2682.
- EFSA.** 2012b. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10: 2740–2749.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).** 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fish. Tech. Paper*, 469: 1–97.
- FAO.** 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma, Italia.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization).** 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of joint FAO/WHO working group. London, Ontario, Canada. 11 p.
- Farzanfar, A.** 2006. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 48: 149–158.

- Gatesoupe, F. J.** 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 107–114.
- Gillor, O., A. Etzion, and M. A. Riley.** 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81: 591–606.
- Irianto, A. and B. Austin.** 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 25: 333–342.
- Kirkup, B. C.** 2006. Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: theoretical considerations, applied research, and practical applications. *Curr. Med. Chem.*, 13: 3335–3350.
- Merrifield, D. L., A. Dimitroglou, A. Foey, S. J. Davies, R. T. M. Baker, J. Bøggwald, M. Castex, and E. Ringø.** 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302: 1–18.
- Millette, M., G. Cornut, C. Dupont, F. Shareck, D. Archambault, and M. Lacroix.** 2008. Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic Acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74: 1997–2003.
- Nayak, S. K.** 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 2–14.
- Pérez-Sánchez, T., I. Ruiz-Zarzuela, I. de Blas, and J. L. Balcázar.** 2014. Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Rev. Aquaculture*, 6: 133–146.
- Ringø, E. and W. Holzapfel.** 2000. Identification and characterization of carnobacteria associated with the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Syst. Appl. Microbiol.*, 23: 523–527.
- Ringø, E., H. R. Bendiksen, M. S. Wesmajervi, R. E. Olsen, P. A. Jansen, and H. Mikkelsen.** 2000. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmon salar* L.). *J. Appl. Microbiol.*, 89: 317–322.
- Ringø, E., L. Løvmo, M. Kristiansen, Y. Bakken, I. Salinas, R. Myklebust, R. E. Olsen, and T. M. Mayhew.** 2010. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquac. Res.*, 41: 451–467.
- Ross, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twomey, W. J. Meaney, and C. Hill.** 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *A. Van Leeuw.*, 76: 337–346.
- Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross, and C. Hill.** 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2287–2290.
- Sang, Y. and F. Blecha.** 2008. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim. Health Res. Rev.*, 9: 227–235.
- Subasinghe, R.** 2009. Disease control in aquaculture and the responsible use of veterinary drugs and vaccines: The issues, prospects and challenges. En: “*The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*”, pp. 5–11. Rogers C. y B. Basurco (eds). Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 86. CIHEAM, Zaragoza, España.
- Toranzo, A., B. Magariños, J. L. Romalde, and J. L. Barja.** 2009. Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. En: “*The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture*”, pp. 155–176. Rogers C. y B. Basurco (eds). Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 86. CIHEAM, Zaragoza, España.
- Toranzo, A. E., B. Magariños, and J. L. Romalde.** 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246: 37–61.

- Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, and W. Verstraete.** 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 655–671.
- Vine, N. G., W. D. Leukes, and H. Kaiser.** 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30: 404–427.

APÉNDICES

Listado de abreviaturas y acrónimos

Código genético

**Listado de enzimas de restricción y
secuencias diana específicas**

Glosario

Listado de tablas

Listado de figuras

APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS GENERALES

A_x	Absorbancia o densidad óptica a una longitud de onda "x"
aa	Aminoácido(s)
ABC	Transportador del tipo ABC (del inglés <i>ATP Binding Cassette</i>)
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ADT/TDA	Prueba de difusión en agar (del inglés <i>Agar Diffusion Test</i>)
Agg	Proteína de agregación (del inglés <i>Aggregation Substance</i>)
Aml	Amoxicilina
Amp	Ampicilina
APROMAR	Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España
ARDRA	Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado (del inglés <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>)
ARE	Enterococos resistentes a antibióticos (del inglés <i>Antibiotic Resistant Enterococci</i>)
ARN/RNA	Ácido ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic acid</i>)
ARNm	Molécula de ARN mensajero
ARNr	Molécula de ARN ribosómico
ARNt	Molécula de ARN transferente
ATCC	Del inglés <i>American Type Culture Collection</i>
AXOS	Arabinosilano-oligosacáridos
BLAST	Del inglés, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Cloranfenicol
C-	Grupo carboxilo
C3	Proteína del complemento C3
Cbn	Carnobacteriocina
CE/EC	Comisión Europea (del inglés <i>European Commission</i>)
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
Cip	Ciprofloxacino
Cir	Circularina
CMI/MIC	Concentración Mínima Inhibidora (del inglés <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
Cn	Gentamicina
COS	Chito-oligosacáridos
Cyl	Citolisina o hemolisina β/bacteriocina
Da	Clindamicina
DO_x/OD_x	Densidad óptica o absorbancia a una longitud de onda "x"
EfaAfs	Adhesina de la pared celular de <i>Enterococcus faecalis</i>
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés <i>European Food Safety Authority</i>)
Enl	Enterolisina
Ent	Enterocina
EPS	Exopolisacárido
ERIC-PCR	Secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias-PCR (del inglés <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR</i>)

Ery	Eritromicina
Esp	Proteína extracelular superficial (del inglés <i>Extracellular Surface Protein</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
Fd	Ácido fusídico
FDA	Administración de medicamentos y alimentos americana (del inglés <i>Food and Drug Administration</i>)
FEAP	Federación Europea de Productores de Acuicultura (del inglés, <i>Federation of European Aquaculture Producers</i>)
FEEDAP	Del inglés <i>Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed</i>
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas (del inglés <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
FOS	Fructo-oligosacáridos
GAP	Prácticas Acuícolas Correctas (del inglés <i>Good Aquaculture Practices</i>)
Gas	Gassericina
GeIE	Gelatinasa
GOS	Galacto-oligosacárido
GRAS	Reconocido generalmente como seguro (del inglés <i>Generally Recognized as Safe</i>)
G+C	Contenido de bases guanina y citosina (mol%)
HDC	Histidina descarboxilasa
HK	Del inglés <i>Head-kidney</i>
Hly	Actividad hemolisina/citolisina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
Hyl	Hipotética glicosil hidrolasa (anteriormente hialuronidasa)
ICES	Consejo Internacional para la Explotación del Mar (del inglés <i>International Council for the Exploration of the Sea</i>)
IFN-γ	Interferón-γ (del inglés <i>Interferon-γ</i>)
IL-1β	Interleuquina-1β (del inglés <i>Interleukin-1β</i>)
IL-8	Interleuquina-8 (del inglés <i>Interleukin-8</i>)
IP/PI	Ioduro de propidio (del inglés <i>Propidium Iodide</i>)
JIP	Del inglés <i>Jouy-en-Josas strain collection</i>
K	Kanamicina
KAA	Medio de cultivo KAA (del inglés <i>Kanamycin Aesculin Azide</i>)
LAB	Bacterias lácticas (del inglés <i>Lactic Acid Bacteria</i>)
LDH	Lactato deshidrogenasa (del inglés <i>lactate dehydrogenase</i>)
LDR	Del inglés <i>Left Direct Repeat</i>
LMG	Del inglés <i>Laboratory of Microbiology Gent Bacteria Collection</i>
LMR	Límites Máximos de Residuos
Lta	Lactacina
MAMP	Patrón molecular asociado a microorganismos (del inglés <i>Microbe Associated Molecular Pattern</i>)
MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino

MHC-Iα	Complejo Mayor de Histocompatibilidad-Iα (del inglés <i>Major Histocompatibility Complex-Iα</i>)
MHC-IIα	Complejo Mayor de Histocompatibilidad-IIα (del inglés <i>Major Histocompatibility Complex-IIα</i>)
MOS	Manano-oligosacáridos
MRS	Medio de cultivo MRS (del inglés <i>Man, Rogosa and Sharpe</i>)
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (del inglés <i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>)
m/vol	Relación masa/volumen
N-	Grupo amino
Na	Ácido nalidíxico
NACA	Del inglés <i>Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific</i>
NCIMB	Del inglés <i>National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria</i>
NBT	Nitroazul de tetrazolio (del inglés <i>nitroblue tetrazolium</i>)
NICE	Sistemas de expresión controlados por la nisina A (del inglés <i>Nisin Controlled Expression</i>)
Nis	Nisina
Nit	Nitrofurantoína
NK	Del inglés, <i>Natural Killer</i>
Nor	Norfloxacino
Oa	Ácido oxolínico
ODC	Ornitina descarboxilasa
OP-30	Organización de Productores
orf	Gen hipotético o marco de lectura abierto (del inglés <i>Open Reading Frame</i>)
ORF	Proteína hipotética codificada por un <i>orf</i>
Ot	Oxitetraciclina
P	Penicilina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Ped	Pediocina
PFGE	Electroforesis en campo pulsante (del inglés <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
pI	Punto isoeléctrico
PRR	Receptor de reconocimiento de patrón (del inglés <i>Pattern Recognition Receptors</i>)
QPS	Presunción qualificada de seguridad (del inglés <i>Qualified Presumption of Safety</i>)
RAPD	amplificación al azar de ADN polimórfico (del inglés <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>)
RDR	Del inglés <i>Right Direct Repeat</i>
rep-PCR	PCR que utiliza cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (del inglés <i>Repetitive Element Sequence Based-PCR</i>)
Rif	Rifampicina
S	Estreptomicina
Sak	Sakacina
SCAN	Del inglés <i>Scientific Committee on Animal Nutrition</i>
SI/IS	Secuencia de inserción (del inglés <i>Insertion Sequence</i>)
SOAT	ISP o técnica de inhibición por siembra en picadura (del inglés <i>Stab-On-Agar Test</i>)

SOFIA	Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura (del inglés <i>The State of World Fisheries and Aquaculture</i>)
SOD	Superóxido dismutasa
SPAT	Técnica de inhibición por gota sobre agar (del inglés <i>Spot-On-Agar Test</i>)
Sxt	Trimetoprim-sulfametoxazol
TDC	Tirosina descarboxilasa
Tec	Teicoplanina
Tet	Tetraciclina
TCBS	Del inglés <i>Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose agar</i>
TLC	Cromatografía en capa fina (del inglés <i>Thin-Layer Chromatography</i>)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α (del inglés <i>Tumoral Necrosis Factor</i>)
TSA	Medio de cultivo TSA (del inglés <i>Tryptic Soya Agar</i>)
TSB	Medio de cultivo TSB (del inglés <i>Tryptic Soya Broth</i>)
Ub	Flumequina
UE/EU	Unión Europea (del inglés <i>European Union</i>)
UV	Ultravioleta
Van	Vancomicina
VRE	Enterococos resistentes a la vancomicina (del inglés <i>Vancomycin Resistant Enterococci</i>)
VREF	<i>Enterococcus faecium</i> resistentes a la vancomicina (del inglés <i>Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium</i>)
vol/vol	Relación volumen/volumen
wt/vol	Relación masa/volumen
OMS/ WHO	Organización Mundial de la Salud (del inglés <i>World Health Organization</i>)

2. ABREVIATURAS DE UNIDADES

Da	Dalton
kb	Kilobase
kg	Kilogramo
kDa	Kilodalton
l	Litros
mg	Miligramos
ng	Nanogramos
pb/bp	Pares de bases/ <i>Base pairs</i>
t	Toneladas
ufc/cfu	Unidad formadora de colonia/ <i>Colony forming unit</i>

3. ABREVIATURAS DE GÉNEROS MICROBIANOS

A.	<i>Aeromonas</i> spp.
Al.	<i>Aliivibrio</i> spp.
B.	<i>Bacillus</i> spp.
C.	<i>Carnobacterium</i> spp.
Cl.	<i>Clostridium</i> spp.
D.	<i>Debaryomyces</i> spp.
E.	<i>Enterococcus</i> spp. (en ocasiones se refiere a <i>Escherichia</i> spp., por ej.: <i>E. coli</i>)
Ed.	<i>Edwardsiella</i> spp.
F.	<i>Flavobacterium</i> spp.
L.	<i>Lactococcus</i> spp.
Lb.	<i>Lactobacillus</i> spp.
Lc.	<i>Leuconostoc</i> spp.
Ls.	<i>Listonella</i> spp.
P.	<i>Pediococcus</i> spp.
Ph.	<i>Photobacterium</i> spp.
Ps.	<i>Pseudomonas</i> spp.
R.	<i>Renibacterium</i> spp.
Sc.	<i>Saccharomyces</i> spp.
Sh.	<i>Shewanella</i> spp.
St.	<i>Streptococcus</i> spp.
T.	<i>Tenacibaculum</i> spp.
V.	<i>Vibrio</i> spp.
Vg.	<i>Vagococcus</i> spp.
W.	<i>Weissella</i> spp.
Y.	<i>Yersinia</i> spp.

4. ABREVIATURAS DE GÉNEROS DE ORGANISMOS ACUÁTICOS

- A.** *Artemia* spp.
Br. *Brachionus* spp.
Lt. *Litopenaeus* spp.
O. *Oncorhynchus* spp.
Pr. *Paralichthys* spp.
S. *Scophthalmus* spp.

5. ABREVIATURAS DE NUCLEÓTIDOS

- A (AMP)** Adenina monofosfato o ácido adenílico
C (CMP) Citosina monofostato o ácido citidílico
G (GMP) Guanosina monofosfato o ácido guanidílico
T (TMP) Timidina monofosfato o ácido timidílico
U (UMP) Uridina monofosfato o ácido uridílico

6. ABREVIATURAS Y MASA MOLECULAR DE AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	Abreviaturas		Masa molecular (Da)
No modificados postraducionalmente			
Ácido aspártico	Asp	D	133
Ácido glutámico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asparagina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptófano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117
Modificados postraducionalmente			
Dehidroalanina	Dha	-	
Dehidrobutirina	Dhb	-	
Lantionina	Lan	-	
β-metil-lantionina	MeLan	-	

APÉNDICE 2. CÓDIGO GENÉTICO

		U	C	A	G		
Primera posición (extremo 5')	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	Tercera posición (extremo 3')
		UUC }	UCC }	UAC }	UGC }	C	
		UUA } Leu	UCA }	UAA *	UGA *	A	
		UUG }	UCG }	UAG *	UGG } Trp	G	
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	
		CUC }	CCC }	CAC }	CGC }	C	
		CUA }	CCA }	CAA } Gln	CGA }	A	
		CUG }	CCG }	CAG }	CGG }	G	
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
		AUC }	ACC }	AAC }	AGC }	C	
		AUA }	ACA }	AAA } Lys	AGA } Arg	A	
		AUG } Met	ACG }	AAG }	AGG }	G	
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U	
		GUC }	GCC }	GAC }	GGC }	C	
		GUA }	GCA }	GAA } Glu	GGA }	A	
		GUG }	GCG }	GAG }	GGG }	G	

*Los codones de terminación de la traducción se indican con un asterisco.

APÉNDICE 3. LISTADO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SECUENCIAS DIANA ESPECÍFICAS

Enzima	Secuencia diana ^a
<i>DpnI</i>	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{GA} \blacktriangledown \text{TC} \\ \text{CT} \blacktriangle \text{AG} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
<i>SmaI</i>	$ \begin{array}{c} \text{CCC} \blacktriangledown \text{GGG} \\ \text{GGG} \blacktriangle \text{CCC} \end{array} $
<i>HhaI</i>	$ \begin{array}{c} \text{GCG} \blacktriangledown \text{C} \\ \text{C} \blacktriangle \text{GCG} \end{array} $

^aEl sitio de restricción se indica con el símbolo \blacktriangledown .

APÉNDICE 4. GLOSARIO

Acuicultura	Cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, lo cual implica la intervención del hombre en el proceso de cría para aumentar la producción, en operaciones como la siembra, la alimentación y la protección de depredadores, siendo propiedad de una persona física o jurídica.
Acuicultura continental	Sistema de cultivo, manejo y cosecha de organismos acuáticos en agua dulce.
Acuicultura extensiva	Sistema de cultivo en el que los estanques se mantienen de manera que se favorezca el desarrollo de la fauna acuática con un rendimiento superior al del ecosistema natural. La densidad es baja y la alimentación de los peces es natural. Algunos productores aportan un complemento alimenticio. Estos estanques desempeñan un papel importante y positivo en el paisaje, la gestión del agua y la biodiversidad.
Acuicultura intensiva	Sistema de cultivo en el que además de alcanzar rendimientos mayores de lo que la capacidad del medio natural permite, se ejerce un alto grado de control y manejo del agua y de los organismos, mediante técnicas y sistemas especializados, con el objetivo de alcanzar el máximo rendimiento de acuerdo con los recursos económicos del productor.
Acuicultura marina	También denominada como maricultura. Sistema de cultivo, manejo y cosecha de organismos acuáticos marinos en su hábitat natural o dentro de cercas especialmente construidas en las que se emplea agua de mar.
Aditivos	Sustancias que se añaden intencionadamente a los productos alimenticios sin propósito de cambiar su valor nutritivo y con la finalidad de modificar sus características y técnicas de elaboración y conservación y/o para mejorar su adecuación para el empleo al que se destinan. Dichas sustancias, posean o no valor nutritivo, no se consumen normalmente como alimentos ni se usan como ingredientes característicos de los mismos.
ADN complementario	ADN monocatenario sintetizado <i>in vitro</i> a partir de un molde de ARNm empleando una ADN polimerasa ARN-dependiente.
ADN polimerasa	Enzima que cataliza la síntesis de ADN mediante la adición de desoxinucleótidos trifosfato en sentido 5'–3' a un cebador de ARN o ADN utilizando como molde una cadena de ADN complementario.
Antibiótico	Compuesto antimicrobiano natural sintetizado por microorganismos mediante complejos multienzimáticos (metabolito secundario) que inhibe el crecimiento o la proliferación de bacterias (bacteriostático) o que provoca su muerte (bactericida) y que se emplea como agente quimioterapéutico para el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos y animales. Actualmente, muchos antibióticos son sintéticos y presentan modificaciones químicas que mejoran su potencia o amplifican su espectro de acción.

Bacteriocina	Péptidos o proteínas de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, producidos y secretados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que poseen actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática).
Bacteriocinogenicidad	Capacidad de producir bacteriocinas.
Bacteriófago	Virus capaz de infectar, multiplicarse y provocar la lisis celular de forma específica en bacterias. Los bacteriófagos se consideran como una alternativa a los antibióticos para inactivar los ictiopatógenos en acuicultura.
Bentos	El bentos o sistema bentónico está constituido por el conjunto de organismos marinos adaptados a vivir sobre el fondo acuático, donde permanecen fijos o libres y errantes.
Bioconservación	Técnica de conservación de los alimentos definida como “la prolongación de la vida útil e incremento de la seguridad higiénico-sanitaria de los alimentos mediante la utilización de compuestos naturales de origen animal, vegetal o microbiano que no ejercen efectos perjudiciales para la salud de los consumidores”.
C3	Proteína del sistema inmunitario que tiene un papel central en la activación del sistema de complemento y que contribuye a la respuesta inmune innata. La fracción C3a ejerce una acción anafilotóxica (acción activadora sobre los mastocitos y basófilos que liberan mediadores de la inflamación) y la fracción C3b interviene en el proceso de opsonización para favorecer el fenómeno de la fagocitosis.
Caladero	Zonas marinas donde concurren circunstancias favorables y se pueden encontrar permanentemente determinados stocks con interés pesquero.
Cebador	Oligonucleótido empleado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
Citoquina	Proteínas producidas por las células del sistema inmune que contribuyen a los mecanismos de crecimiento, diferenciación y defensa celular en el hospedador.
CMI	Concentración Mínima Inhibidora, que se define como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano.
Conjugación	Proceso de transferencia de moléculas de ADN plasmídico de una célula bacteriana a otra.
Crustáceos	Extenso subfilo de artrópodos de respiración branquial que cuentan con dos pares de antenas y un número variable de apéndices y que se encuentran recubiertos de un caparazón generalmente calcificado. La mayor parte de ellos son acuáticos, habitando en agua dulce y salada y en todas las profundidades.
Cultivo iniciador	Preparación de microorganismos vivos que se adicionan a la materia prima durante el proceso de elaboración de alimentos mediante la tecnología de la fermentación industrial para modificar, mejorar y estandarizar sus características organolépticas y reológicas.
Cultivo probiótico	Cultivos mixtos o monoespecíficos de microorganismos vivos y componentes de las células microbianas que ejercen efectos beneficiosos en la salud y en el bienestar del hospedador.

Cultivo protector	Preparación de microorganismos vivos que se adicionan a la materia prima durante el proceso de elaboración de alimentos mediante la tecnología de la fermentación industrial para asegurar su calidad higiénico-sanitaria y seguridad e incrementar su vida útil mediante la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes.
Dominio	Región de una molécula de proteína o ADN que posee una función o conformación específica.
Estallido respiratorio	Mecanismo del sistema inmune innato en el que los leucocitos liberan especies reactivas de oxígeno (radicales superóxido y peróxido de oxígeno) con actividad bactericida.
Expresión génica	Proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento.
Extensión N-terminal	Secuencia de 15–30 aminoácidos localizada en la región N-terminal de la mayoría de las proteínas recién sintetizadas que será eliminada durante o tras el proceso de secreción de la proteína a través de la membrana citoplasmática.
Factor de virulencia	Molécula efectora que potencia la capacidad de un microorganismo de causar enfermedad.
Fagocitosis	Proceso de ingestión de microorganismos o partículas realizado por leucocitos que produce una activación temprana de la respuesta inflamatoria antes de la producción de anticuerpos y que juega un papel importante como defensa innata frente a los patógenos.
Fermentación	Proceso anaeróbico llevado a cabo por levaduras y/o bacterias, por el que se metabolizan los hidratos de carbono (principalmente azúcares), obteniéndose como productos finales compuestos orgánicos (<i>e.g.</i> , ácido láctico, etanol, dióxido de carbono y/o ATP).
Gen	Segmento de ADN que codifica un péptido, una proteína o una molécula de ARN.
Inmunoestimulante	Compuesto que modula el sistema inmunitario del hospedador para mejorar su respuesta inmunitaria frente a los microorganismos patógenos y prevenir las enfermedades.
Inmunoglobulinas	Glicoproteínas que constituyen parte de la defensa humoral específica del sistema inmune, cuya función principal es identificar y neutralizar los elementos extraños al hospedador (bacterias, virus y parásitos).
Larvicultura	Cultivo de organismos acuáticos durante la fase larvaria.
Levaduras	Hongos, generalmente unicelulares, que se reproducen vegetativamente por gemación. <i>Saccharomyces</i> es uno de los aproximadamente 40 géneros de levaduras ascoporógenas que se conocen, en el que se incluyen siete especies, entre las que se encuentran las levaduras más habitualmente utilizadas en la industria alimentaria (<i>i.e.</i> , <i>S. cerevisiae</i>).

Lisozima	Enzima de 14,4 kDa que daña las células bacterianas catalizando la hidrólisis de las uniones 1,4- β entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina del peptidoglicano. Se considera como una de las enzimas bactericidas más importantes de la inmunidad innata. Se encuentra en numerosas secreciones como saliva, lágrimas y mucus y también en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos polimorfonucleares.
Metabolito primario	Producto del metabolismo bacteriano generado durante la fase exponencial de crecimiento.
Metabolito secundario	Producto del metabolismo bacteriano, no esencial para el crecimiento o el mantenimiento de las funciones celulares, generado durante la fase estacionaria de crecimiento.
Operón	Conjunto de genes transcritos bajo el control de un único promotor, cuyos productos intervienen en la misma función biológica.
Peces anádromos	Son peces diádromos que habitan en el mar pero van al agua dulce para reproducirse (<i>e.g.</i> , salmón Atlántico).
Peces anfídromos	Son peces diádromos que se mueven entre el mar y el agua dulce o viceversa pero no por causas reproductivas (<i>e.g.</i> , mújoles o lisas).
Peces cartilagosos	Son peces que poseen hendiduras branquiales externamente visibles y un esqueleto compuesto sólo de cartílago (<i>e.g.</i> , rayas y tiburones).
Peces catádromos	Son peces diádromos que habitan en el agua dulce pero van al mar para reproducirse (<i>e.g.</i> , anguila).
Peces diámódros	Son peces migratorios que habitan en aguas dulces y saladas. Pueden ser de tres tipos: anádromos, catádromos y anfídromos.
Peces oceanodromos	Son peces migratorios cuyos movimientos tienen lugar exclusivamente en el mar (<i>e.g.</i> , atunes).
Peces potamodromos	Son peces migratorios cuyos movimientos tienen lugar exclusivamente en el agua dulce (<i>e.g.</i> , trucha común).
Peces teleósteos	Son peces que poseen un esqueleto óseo y branquias protegidas mediante un opérculo (<i>e.g.</i> , rodaballo, dorada, lubina, salmón, trucha, etc.).
Péptido señal	Extensión N-terminal de las proteínas recién sintetizadas reconocida por el sistema Sec o Ruta General de Secreción.
Pesca extractiva	Actividad pesquera que tiene por objetivo capturar, cazar o recolectar recursos hidrofóbicos, tanto de forma industrial como artesanal. En este concepto no están incluidas la acuicultura ni la pesca deportiva.
Prebiótico	Sustancia o producto no digerible como los (1) oligosacáridos, entre los que se incluyen los (i) fructo-oligosacáridos (FOS), (ii) galacto-oligosacáridos (GOS), (iii) manano-oligosacáridos (MOS), (iv) arabinoxilano-oligosacáridos (AXOS) y (v) chito-oligosacáridos (COS), y (2) polisacáridos como la inulina (fructano de cadena larga) y β -glucanos (polisacáridos de D-glucosa unidos por enlaces β -glucosídicos) que: (i)

	sirven de sustrato para bacterias beneficiosas del tracto gastrointestinal y estimulan su crecimiento o actividad metabólica, (ii) modifican favorablemente la microbiota intestinal, y, por último, (iii) ejercen efectos beneficiosos en el hospedador, tanto a nivel sistémico como intestinal.
Preprobacteriocina	Precursor de la bacteriocina biológicamente inactivo constituido por una extensión N-terminal (secuencia líder o péptido señal) y un propéptido C-terminal (probacteriocina).
Probacteriocina	Forma de la bacteriocina en la que, en su caso, se ha eliminado la extensión N-terminal implicada en su secreción, pero que aún no ha sufrido las modificaciones postraduccionales que darán lugar a la bacteriocina madura.
Probiótico	Microorganismo vivo que, cuando se administra en cantidades adecuadas, confiere un beneficio a la salud del hospedador. En acuicultura, los probióticos se consideran como cultivos microbianos vivos que ejercen un efecto beneficioso en el hospedador mediante: (i) la modificación de su microbiota y/o la de su medio ambiente; (ii) el incremento de la eficiencia en la asimilación del alimento y/o de su valor nutritivo; (iii) el incremento de la resistencia del hospedador frente a las enfermedades, y/o (iv) el incremento de la calidad del medio ambiente acuático en el que se desarrolla el hospedador.
Resistencia adquirida	Resistencia de una cepa particular de una especie a un determinado antibiótico por la modificación de la carga genética y que puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética.
Resistencia adquirida transmisible	Resistencia de una cepa particular de una especie a un determinado antibiótico debido a la presencia de determinantes genéticos y que se transfieren a través de plásmidos, transposones o integrones de una bacteria a otra (transmisión horizontal).
Resistencia intrínseca	Resistencia inherente de una especie bacteriana por la ausencia de diana a un determinado antibiótico. También se denomina resistencia natural.
Secuencia –10	Secuencia de la región promotora de un gen situada aproximadamente 10 pb delante del codón de iniciación de un gen, cuya secuencia consenso es TATAAT.
Secuencia –35	Secuencia de la región promotora de un gen situada aproximadamente 35 pb delante del codón de iniciación de un gen, cuya secuencia consenso es TTGACA.
Secuencia consenso	Segmento de un gen/proteína que es compartido por un gran número de miembros de una familia génica/proteica, cuya secuencia representa los residuos nucleotídicos/aminoácídicos encontrados más frecuentemente en cada posición (residuos conservados).
Sistema de complemento	Conjunto de moléculas plasmáticas implicadas en distintas cascadas bioquímicas, cuyas funciones son potenciar la respuesta inflamatoria, facilitar la fagocitosis y dirigir la lisis de células incluyendo la apoptosis.
Sistema de secreción del tipo ABC	Sistema de secreción de péptidos sintetizados con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder en el que participan una proteína transportadora del tipo ABC y una

	proteína accesoria, dedicados específicamente a la secreción de una sustancia determinada.
Sistema Sec	Sistema de secreción de péptidos sintetizados con una extensión N-terminal del tipo péptido señal en el que participan los productos de los genes Sec y las peptidasas señal encargadas del procesamiento del prepropéptido.
Traducción	Proceso de síntesis de una proteína a partir de una molécula de ARNm (que contiene la información genética necesaria para codificar una o varias proteínas mediante su traducción a producto génico en los ribosomas).
Transcripción	Proceso de síntesis de una molécula de ARNm a partir del ADN.
Transformación	Proceso de asimilación de moléculas de ADN por una célula bacteriana.
Transportador del tipo ABC	Homodímero de proteína(s) (aprox. 700 aa) que contiene: (i) un dominio C-terminal o de unión al ATP con actividad ATPasa, que contienen los motivos Walker A y Walker B, el motivo C y la región de cambio, y (ii) un dominio central integral de membrana, que contiene 4–6 segmentos transmembrana. En la mayoría de los transportadores del tipo ABC dedicados al transporte de bacteriocinas existe un dominio adicional o dominio N-terminal con actividad proteolítica, que contiene dos secuencias conservadas denominadas dominio cisteína y dominio histidina.
Transposón	Elemento genético móvil o secuencia de ADN con capacidad de desplazarse (transponerse) de un lugar del ADN a otro.
Vacuna	Cualquier preparación de microorganismos muertos o vivos atenuados o de productos o derivados de microorganismos destinados a generar inmunidad frente a una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos.
Vector	Molécula de ADN de pequeño tamaño molecular con capacidad de replicarse, en la que se inserta un fragmento de ADN exógeno objeto de estudio (<i>e.g.</i> , plásmidos).

APÉNDICE 5. LISTADO DE TABLAS

Capítulo II

Tabla II.1.	Producción y utilización de la pesca de captura y la acuicultura en el mundo.....	38
Tabla II.2.	Producción acuícola por continente del total de la producción mundial.....	39
Tabla II.3.	Producción mundial de grupos de especies cultivadas procedentes de la acuicultura en aguas continentales y en cultivo marino en 2012.....	40
Tabla II.4.	Producción y distribución de las principales especies cultivadas en España procedentes de la acuicultura continental y marina en 2013.....	44
Tabla II.5.	Estudios realizados sobre el empleo de microorganismos como probióticos en acuicultura continental y marina	74
Tabla II.6.	Preparaciones probióticas comerciales empleadas en acuicultura.....	80

Capítulo III/Chapter III

Table 1.	<i>Origin and direct antimicrobial activity against fish pathogens of LAB isolated from aquatic animals.....</i>	99
Table 2.	<i>Preliminary safety evaluation of enterococci.....</i>	103
Table 3.	<i>Extracellular antimicrobial activity of the 49 pre-selected LAB.....</i>	105
Table 4.	<i>Enzymatic activity profiles of the 49 pre-selected LAB</i>	106
Table 5.	<i>MICs distribution of 10 antibiotics for the 9 enterococcal strains</i>	108
Table 6.	<i>MICs distribution of 15 antibiotics for the 40 non-enterococcal strains</i>	109

Capítulo IV/Chapter IV

Table 1.	<i>Source and taxonomic identification of the aquatic LAB strains analyzed in this study.....</i>	122
-----------------	---	-----

Capítulo V/Chapter V

Table V.1.	<i>Origin of the E. faecium strains used in this study.....</i>	131
Table V.2.	<i>Primers and PCR conditions used in this study</i>	132
Table V.3.	<i>Virulence markers and ampicillin susceptibility of E. faecium strains</i>	135

Capítulo VI/Chapter VI

Table VI.1.	<i>Experimental designs for the A. franciscana gnotobiotic challenge tests</i>	153
Table VI.2.	<i>Antimicrobial activity, co-culture with V. campbellii LMG21363 and survival in seawater of LAB strains.....</i>	155
Table VI.3.	<i>Survival percentage of A. franciscana nauplii fed with LAB strains and challenged with V. campbellii LMG21363 in FASW.....</i>	156

Table VI.4.	<i>Survival percentage of A. franciscana nauplii fed with LAB strains and challenged with V. campbellii LMG21363 in FASW supplemented with glucose</i>	157
Table VI.5.	<i>Survival percentage of A. franciscana nauplii fed with LAB strains and challenged with V. campbellii LMG21363 in FASW supplemented with MRS broth</i>	158
Table VI.6.	<i>Survival percentage of A. franciscana nauplii fed with pooled LAB strains and challenged with V. campbellii LMG21363 in FASW.....</i>	158

Capítulo VII/Chapter VII

Table 1.	<i>In vitro effect of heat-inactivated and viable LAB on the viability of turbot head-kidney leucocytes</i>	173
Table 2.	<i>Annexin-V and PI staining after incubation of turbot head-kidney leucocytes with viable LAB strains</i>	173

Capítulo VIII/Chapter VIII

Table 1.	<i>Primers used for real-time PCR.....</i>	187
Table 2.	<i>Direct antimicrobial activity of LAB against turbot pathogens.....</i>	187
Table 3.	<i>Survival in seawater and tolerance to low pH and turbot bile of LAB</i>	188
Table 4.	<i>Adhesion of LAB to turbot skin and intestinal mucus and polystyrene</i>	188
Table 5.	<i>Inhibition of the adhesion of turbot pathogens to skin and intestinal mucus by LAB</i>	189

APÉNDICE 6. LISTADO DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 2.1.	<i>Estanque en el jardín</i>	34
Figura 2.2.	<i>Reproducción del libro de Fan Lei (475 a. C.)</i>	35
Figura 2.3.	<i>Evolución de la producción acuática mundial (acuicultura y pesca de captura) en el periodo 1950–2012.....</i>	38
Figura 2.4.	<i>Ejemplar de rodaballo adulto</i>	45
Figura 2.5.	<i>Ciclo de producción del rodaballo.....</i>	46
Figura 2.6.	<i>Esquema del funcionamiento del sistema inmune de los peces teleósteos.</i>	64

Capítulo IV/Chapter IV

Figure 1.	<i>(A) Schematic representation of the nucleotide region involved in tyramine production in E. faecium DO (upperfigure) and E. faecium BCS59 and MV5 (lowerfigure). (B) Partial nucleotide sequence located upstreamtdc in E. faecium DO (upper sequence), and E. faecium BCS59 and MV5 (lower sequence).....</i>	124
------------------	---	-----

Capítulo V/Chapter V

Figure 5.1.	<i>Dendrogram of PFGE-SmaI digestion patterns showing the genetic relationships amongst the 14 E. faecium strains</i>	136
Figure 5.2.	<i>Dendrogram of RAPD patterns showing the genetic relationships amongst the 14 E. faecium strains.....</i>	136
Figure 5.3.	<i>Dendrogram of ERIC-PCR patterns showing the genetic relationships amongst the 14 E. faecium strains.....</i>	137
Figure 5.4.	<i>Dendrogram of ARDRA-HhaI digestion patterns showing the genetic relationships amongst the 14 E. faecium strains.....</i>	138

Capítulo VI/Chapter VI

Figure 6.1.	<i>Methodology to obtain axenic A. franciscana nauplii and experimental design of gnotobiotic challenge tests.....</i>	152
--------------------	--	-----

Capítulo VII/Chapter VII

Figure 1.	<i>Effect of heat-inactivated LAB on the viability (A) and cytotoxicity (B) in turbot HK leucocytes determined by MTT and LDH assays, respectively.....</i>	172
Figure 2.	<i>Effect of heat-inactivated and viable LAB on the respiratory burst activity in turbot HK leucocytes determined by NBT reduction assay</i>	174
Figure 3.	<i>Effect of heat-inactivated and viable LAB on the phagocytosis of turbot HK leucocytes determined by flow cytometry</i>	175
Supplementary Figure 1.	<i>Analysis of turbot HK leucocytes viability by flow cytometry</i>	179

Capítulo VIII/Chapter VIII

Figure 1.	<i>LAB cell surface hydrophobicity.....</i>	188
Figure 2.	<i>Cumulative mortality curves (%) of turbot larvae (A) and juveniles (B) bathed with LAB or pathogens at different concentrations</i>	189
Figure 3.	<i>Expression of IL-1β (A), TNF-α (B), MHC-Iα (C), MHC-IIα (D), lysozyme (E) and C3 (F) transcripts in head-kidney, spleen, liver, intestine and skin of turbot juveniles at 24 h after the first (B1) and the second bath (B2) with Lc. cremoris SMM69 and W. cibaria P71 determined by real-time PCR.....</i>	190

Capítulo IX

Figura 9.1.	<i>Evaluación fenotípica de la actividad hemolítica en Columbia agar con sangre de caballo (5%, v/v) (A) y actividad gelatinasa en Todd-Hewitt agar con gelatina (3%, v/v) (B) de enterococos de origen acuático.....</i>	202
Figura 9.2.	<i>Evaluación Evaluación de la susceptibilidad de E. faecium NV54 frente a 22 antibióticos de importancia clínica en medicina humana y veterinaria empleando la técnica de disco sobre agar (CLSI, 2011).....</i>	204

Figura 9.3.	Evaluación fenotípica de la desconjugación de sales biliares por bacterias lácticas de origen acuático en MRS con L-cistina y taurodeoxicolato.....	210
Figura 9.4.	Evaluación fenotípica de la actividad mucinolítica de bacterias lácticas de origen acuático en placas con mucina	211
Figura 9.5.	Evaluación fenotípica de la producción de tiramina por bacterias lácticas de origen acuático mediante un ensayo en placa	213
Figura 9.6.	Evaluación fenotípica de la producción de histamina (A), putrescina (B) y tiramina (C) por bacterias lácticas de origen acuático mediante TLC	214
Figura 9.7.	Imágenes de microscopía óptica de nauplios de <i>A. franciscana</i>	222
Figura 9.8.	Imágenes de microscopía óptica de fagocitosis de partículas de zymosan por leucocitos de riñón anterior de rodaballo y sus correspondientes controles con tinción Hemacolor®	228
Figura 9.9.	Larvas (A, C) y juveniles (B, D) de rodaballo afectados por vibriosis y tenacibaculosis, respectivamente.....	230

